

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. R. Maier
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum
Gießen und Marburg GmbH
Standort Marburg

**Funktionelle und pathophysiologische
Untersuchung neuer Mutationen des
Natrium-Chlorid-Cotransporters der Niere
beim Gitelman Syndrom**



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Caroline Knop

aus

Dortmund

Marburg (Lahn), 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
14.10.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. S. Waldegger

Korreferent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Die Aufgaben der Niere.....	1
1.2	Elektrolytrückresorption entlang des Tubulussystems	3
1.2.1	Elektrolyttransport entlang des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife ..	6
1.2.2	Elektrolyttransport entlang des distalen Convolutes	8
1.2.3	Konsequenzen des gestörten Transports von Natrium und Chlorid entlang des Nephrons	10
1.3	Hereditäre Salzverlusttubulopathien	11
1.3.1	Das antenatale Bartter Syndrom (Hyperprostaglandin E Syndrom).....	15
1.3.2	Das antenatale Bartter Syndrom mit Innenohr-Taubheit	15
1.3.3	Klassisches Bartter Syndrom	16
1.3.4	SeSAM Syndrom.....	16
1.3.5	Gitelman Syndrom.....	17
1.3.5.1	Der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCCT) und das SLC12A3-Gen	18
1.3.5.2	Mutationen und Polymorphismen des NCCT.....	19
1.3.5.3	Funktionelle Untersuchungen von Mutationen des NCCT	19
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	24
2.1	Material.....	24
2.1.1	Geräte.....	24
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3	Chemikalien / Reagenzien / Substanzen	28
2.1.4	Hergestellte Puffer & Lösungen.....	30
2.1.4.1	Für Oozytenpräparation	30
2.1.4.2	Für Mutagenesen	31
2.1.4.3	Für Western Blot.....	32
2.1.4.4	Für Immunfluoreszenz	34
2.1.5	Konstrukte.....	35
2.1.6	Antikörper	35
2.1.7	Bakterienstämme	35
2.1.8	Versuchstiere.....	35
2.1.9	Reagenzsysteme	36
2.1.10	Oligonukleotide	36
2.1.11	Software	38

2.2	Methoden	39
2.2.1	Sequenzieren des Flag NCCT x pT7Ts	39
2.2.2	DNA Synthese.....	40
2.2.2.1	Mutagenese.....	40
2.2.2.2	Mini-Präparation.....	43
2.2.2.3	Midi-Präparation.....	45
2.2.2.4	Glycerolstocks	46
2.2.3	RNA Synthese	46
2.2.3.1	Linearisierung der DNA.....	46
2.2.3.2	Gelelektrophorese	47
2.2.3.3	c-RNA-Synthese.....	48
2.2.4	Oozytenpräparation	49
2.2.5	Oozyteninjektion	50
2.2.6	Funktionelle Chlorid-Isotop ($^{36}\text{Cl}^-$) Uptake-Messungen.....	51
2.2.7	Western Blot	52
2.2.8	Immunfluoreszenz an Oozytenschnitten.....	54
2.2.9	Auswertung und Statistik	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Darstellung der Mutationen und Patientendaten	56
3.1.1	Fallbeispiele	57
3.1.1.1	1. Fallbeispiel: Patient mit Mutation R135C	57
3.1.1.2	2. Fallbeispiel: Patient mit Mutation T180R	58
3.1.1.3	3. Fallbeispiel: Patient mit Mutation S614P	58
3.1.1.4	4. Fallbeispiel: Patient mit Mutation V1015M	59
3.2	Funktionelle Analyse der Mutationen und Polymorphismen.....	60
3.3	Untersuchungen zum Pathomechanismus	62
3.3.1	Proteintranslation.....	62
3.3.2	Proteintrafficking.....	64
3.3.3	Regulation der Transporteraktivität.....	67
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	69
4	Diskussion	70
4.1	Diskussion der angewandten Methode	70
4.2	Diskussion der Ergebnisse	71
4.2.1	Klinische Daten	71
4.2.2	Funktionelle Daten	72

4.2.3	Potentieller Pathomechanismus.....	73
4.2.3.1	Gestörte Proteintranslation.....	73
4.2.3.2	Gestörte Oberflächenexpression.....	74
4.2.3.3	Gestörte intrinsische Aktivität des Transporters.....	77
4.2.4	Schlussfolgerung	78
5	Zusammenfassung	80
6	Anhang	82
6.1	Literaturverzeichnis.....	82
6.2	Abbildungsverzeichnis	96
6.3	Tabellenverzeichnis.....	97
6.4	Abkürzungsverzeichnis	98
6.5	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	100
6.6	Danksagung	101
6.7	Ehrenwörtliche Erklärung.....	102
6.8	Lebenslauf	103

1 Einleitung

1.1 Die Aufgaben der Niere

Die Niere ist das wichtigste Ausscheidungsorgan des menschlichen Körpers. Sie ist in ihrer Funktion sehr komplex und übernimmt viele wichtige Aufgaben bei der Regulation des Elektrolyt-, Volumen-, Mineral- und Säure-Basen-Haushaltes. Daneben spielt sie als endokrines Organ eine wichtige Rolle in der Steuerung des Blutdruckes, der Skelettmineralisation und der Erythropoese.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere wird durch das Nephron gebildet, von denen die Nieren gemeinsam 2 Millionen enthalten. Ein Nephron besteht jeweils aus einem Glomerulum mit Bowman-Kapsel und einem Tubulussystem (Abbildung 1-1). In dem Glomerulum wird aus dem Blut der Primärharn abfiltriert, welcher frei von korpuskulären Elementen des Blutes und nahezu eiweißfrei ist, während die Konzentration der gelösten niedermolekularen Stoffe der Plasmakonzentration entspricht (Schmidt, 1987). Aus dem Ultrafiltrat entsteht anschließend durch Resorption und Sekretion von Substanzen in den morphologisch und funktionell unterschiedlichen Abschnitten des Tubulussystems der Endharn. Die hohe Filtrationsleistung wird durch eine besonders hohe Durchblutung der Nieren gewährleistet. Sie beträgt beim Erwachsenen rund 1,2l/min, was einem Anteil des Herzzeitvolumens in Ruhe von ca. 25% entspricht (Schmidt, 1987). 90 % des Blutes durchströmen den Nierencortex, der die Glomeruli beinhaltet (Klinke, 2005). Durch Anpassung des Eingangswiderstandes vor den Glomeruli kann die Nierendurchblutung auch bei systemischen Blutdruckschwankungen im Bereich von 80-200mmHg konstant gehalten werden. Das ist die Voraussetzung für die tägliche Produktion von 180l Ultrafiltrat, von dem nach der Rückresorption von Wasser und Elektrolyten im Tubulussystem nur rund 1,5l Endharn ausgeschieden werden.

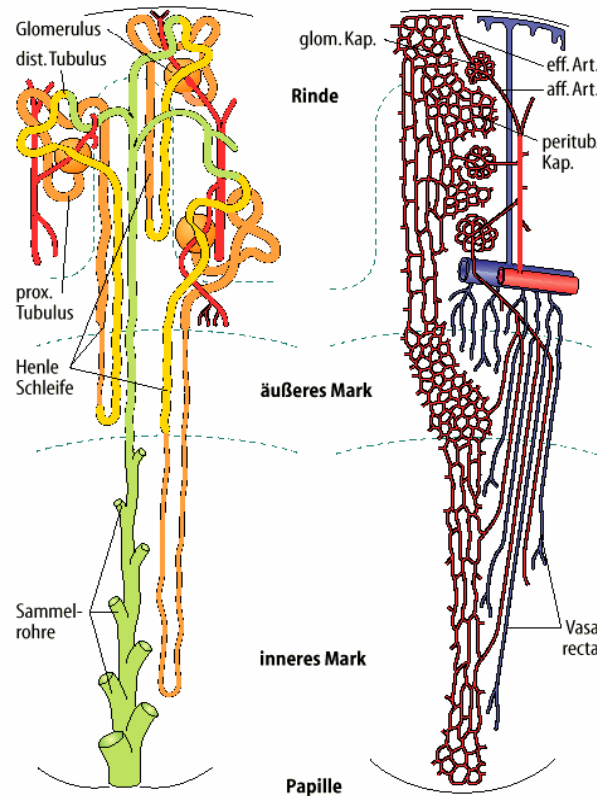


Abbildung 1-1: Strukturelle Organisation der Niere

Links: 3 Nephronen und das Sammelrohrsystem. In Orange sind die Glomeruli mit den anschließenden proximalen gewundenen Tubuli und dem geraden absteigenden Teil der Henle-Schleife dargestellt, in Gelb die weiteren Teile der Henle-Schleife und der distale gewundene Teil des Tubulussystems. In Grün stellt sich das Sammelrohrsystem dar.

Rechts: Die Blutversorgung und Anordnung der Gefäße der Niere.

Aus „Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie“; Schmidt, R.F. (Hrsg.), Lang, F. (Hrsg.); 30.Auflage (2007), S.684

1.2 Elektrolytrückresorption entlang des Tubulussystems

Der Elektrolyt- und Wassertransport entlang des Tubulussystems spielt eine zentrale Rolle bei der Generierung des Endharns. Das tubuläre System wird in den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und in das Sammelrohr unterteilt. Zur Anpassung des Körpers an die wechselnden physiologischen Elektrolyt- und Wasserverhältnisse ist ein System von verschiedenen transepithelialen Transportproteinen vorhanden, welche für Ionentransportprozesse an unterschiedlichen Orten des Tubulussystems verantwortlich sind.

Die Tubulusepithelzellen sind polare Zellen, deren luminale Seite sich von der basolateralen Membran auf der Blutseite funktionell unterscheidet. Die Durchlässigkeit dieser beiden Membranen ist entscheidend für den transzellulären Transport. Für die meisten Transportprozesse ist die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ an der basolateralen Seite der Motor. Unter ATP Verbrauch wird Na^+ primär aktiv aus der Zelle ins Blut gepumpt. Auf diese Weise entstehende Elektrogradienten sind für den Transport zahlreicher Stoffe essentiell.

Den größten Anteil der Na^+Cl^- -Rückresorption nimmt der proximale Abschnitt des Tubulussystems der Niere mit 60% ein. Angetrieben durch die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in der basalen Membran wird Na^+ aus der Zelle in das Interstitium und K^+ in die Zelle befördert. Die dabei entstehende elektrochemische Potentialdifferenz sorgt dafür, dass zum einen aufgrund des negativen intrazellulären Potentials, zum anderen aufgrund des chemischen Konzentrationsgradienten Na^+ passiv aus dem Tubuluslumen in die Zelle einströmt. Dieser Einstrom ist treibende Kraft für den $\text{Na}^+\text{-Cotransport}$ weiterer Substanzen in die Tubuluszelle. Hervorgerufen durch die erhöhte Chloridkonzentration der Tubulusflüssigkeit im Vergleich zum Interstitium kommt es zum parazellulären Fluß von Chloridionen ins interstitielle Nierengewebe. Gleichzeitig kommt es über diesen Shunt zum parazellulären Transport von Na^+ . Eine weitere Möglichkeit der Na^+ Rückresorption erfolgt passiv durch den Solvent Drag, dabei folgt aus osmotischen Gründen Wasser der oben beschriebenen Elektrolytwanderung. Mit diesem Wasserstrom werden weitere Elektrolyte und andere gelöste Stoffe (z.B. Harnstoff, Natrium, Chlorid) passiv mittransportiert.

Der Anfangsteil der Henle-Schleife entspricht in den Transportereigenschaften dem proximalen Tubulus, allerdings mit geringerer Kapazität. Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife werden rund 25% des Salzes rückresorbiert. Wieder ist die Natriumpumpe an der basalen Membran die treibende Kraft der Transportprozesse. Hier spielt an der luminalen Membran der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Transporter (NKCC2) die entscheidende Rolle. Durch die fehlende Wasserresorption in diesem Nephronteil wird die Tubulusflüssigkeit hypoton und das Interstitium hyperton, was wichtig für die spätere Harnkonzentrierung ist.

Im distalen Teil werden noch 10% des Salzes zurücktransportiert, hier ist der $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter (NCCT) für den Elektrolyttransport verantwortlich, der ebenfalls indirekt durch die Natriumpumpe angetrieben wird.

Schließlich werden im Sammelrohr noch 5% des Salzes durch einen Na^+ -Kanal resorbiert, welcher durch Aldosteron und ADH aktivierbar ist. Die letzten Nephronabschnitte sind für Wasser durchlässig und damit für die Harnkonzentrierung und die Feineinstellung der renalen Ausscheidung von Bedeutung (Abbildung 1-2).

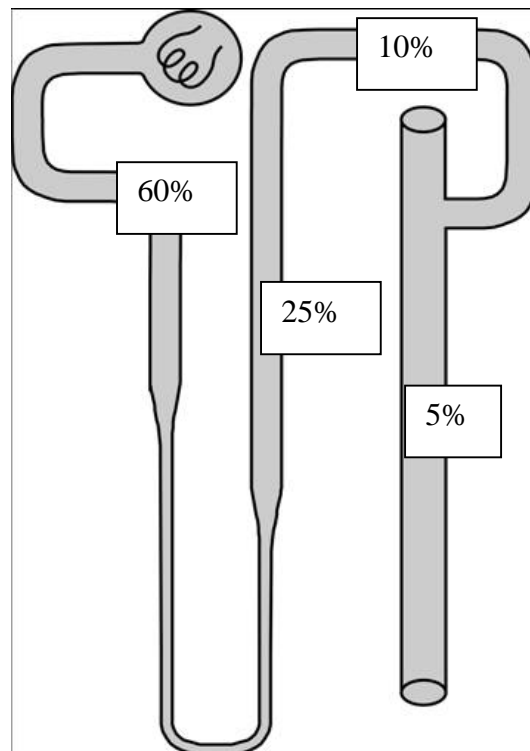


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Nephrons mit den einzelnen Anteilen der Na⁺-Rückresorption

Entlang des Nephrons werden im proximalen Abschnitt 60% des Natriums rückresorbiert, in Bereich der Henle-Schleife 25%, im distalen Tubulus 10% und im Sammelrohr noch rund 5%.

Bei den zu untersuchenden vererbten Salzverlusttubulopathien geht es um Defekte der Transporter im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und im distalen Tubulus. Deswegen werden die Transportsysteme in diesen Bereichen eingehender erklärt.

1.2.1 Elektrolytttransport entlang des dicken aufsteigenden Teils der Henle-Schleife

Dominierender Transporter vom Lumen in die Epithelzelle im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife (thick ascending limb: TAL) ist der Furosemid sensitive Na^+ - K^+ - 2Cl^- -Cotransporter (NKCC2). Es handelt sich dabei um einen sekundär aktiven Transportprozess von Na^+ , K^+ und 2Cl^- , der durch eine niedrige intrazelluläre Na^+ -Konzentration angetrieben wird. Die niedrige Na^+ -Konzentration in der Zelle wird wiederum durch die basolaterale Na^+ - K^+ -ATPase aufrechterhalten, so dass für Na^+ ein elektrochemischer Gradient entsteht. Während K^+ an der apikalen Membran über den ROMK K^+ -Kanal (renal outer medulla K channels) wieder in das Lumen zurücktransportiert wird, wird Cl^- an der basolateralen Seite von zwei homologen Chloridkanälen (ClC-Ka und ClC-Kb) aus der Zelle ins Gefäßsystem befördert (Abbildung 1-3) (Jeck *et al.*, 2005). Auf diese Weise entsteht ein lumenpositiver Spannungsgradient, der wichtig für den parazellulären Transport ist.

Neben der Elektrolytresorption ist dieser Teil des Tubulussystems Voraussetzung für den osmotischen Gradienten zur Harnkonzentrierung entlang des Sammelrohres, da die Henle-Schleife nicht permeabel für Wasser ist und dadurch in diesem Teil ein hypertones Interstitium entsteht. Somit führen Beeinträchtigungen der Transporter im TAL einerseits zu einem Salzverlust, andererseits zu einer reduzierten Kapazität für die Harnkonzentrierung.

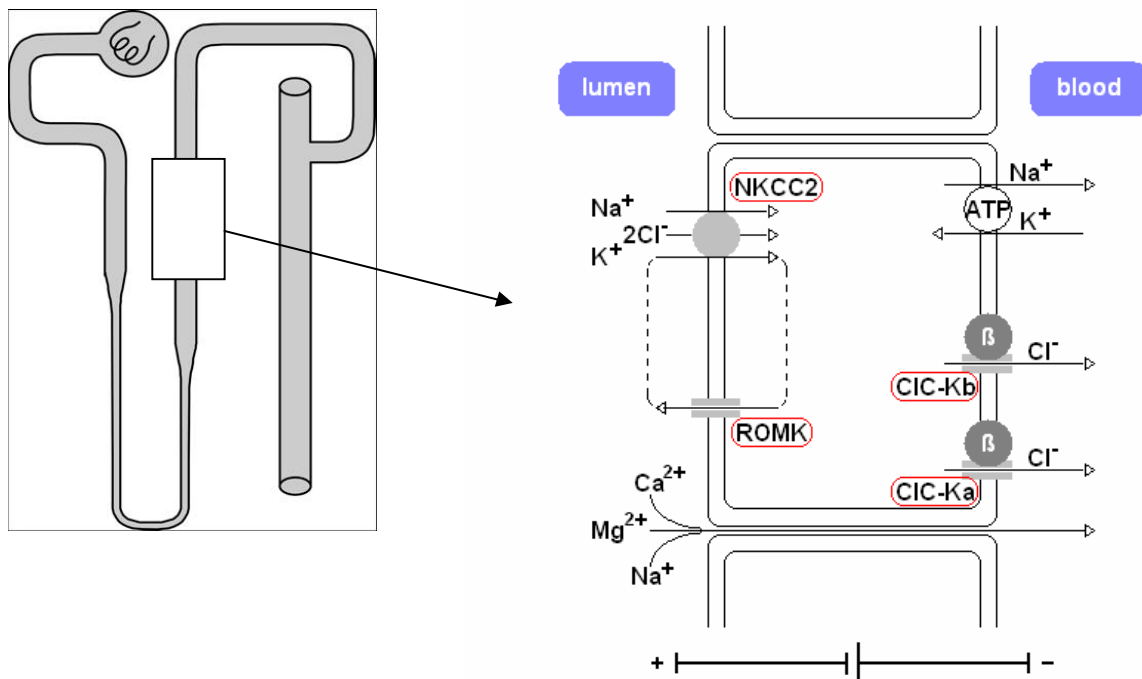


Abbildung 1-3: Modell der Transportprozesse entlang des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife (TAL)

An der luminalen Seite der Tubulusepithelzelle kommen die Transportproteine NKCC2 und ROMK zur Darstellung. An der basolateralen Seite sieht man zum einen die Natrium-Kalium-Pumpe und zum anderen die zwei homologen Chloridkanäle, die im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife exprimiert sind. Die Pfeile beschreiben die Richtung des Transportes.

1.2.2 Elektrolyttransport entlang des distalen Convolutes

Ebenso wie in den anderen Nephronabschnitten werden die Transportprozesse im distalen Tubulus (distal convoluted tubule, DCT) an der apikalen Membran indirekt von der basolateralen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ angetrieben, die den elektrochemischen Gradienten für Natrium aufbaut. In diesem Abschnitt des Tubulssystems ist der Thiazid sensitive $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ -Cotransporter, NCCT, für den Hauptteil des apikalen Na^+Cl^- -Transportes verantwortlich (Costanzo, 1985; Ellison *et al.*, 1987; Kunau *et al.* 1975; Plotkin *et al.* 1996; Velazquez *et al.*, 1984).

Der Transporter hat strukturelle Ähnlichkeit mit dem NKCC2-Protein, aber transportiert im Gegensatz dazu nur ein Natrium- und ein Chlorid-Ion in die Epithelzelle hinein. Chlorid wird wie im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife passiv über den basolateralen ClC-Kb Kanal aus der Zelle gebracht, der andere Chloridkanal, ClC-Ka , ist in diesem Teil des Nephrons vermutlich nicht exprimiert (Abbildung 1-4) (Jeck *et al.*, 2005).

Entlang des distalen Tubulus lassen sich zwei verschiedene funktionelle Anteile beschreiben (DCT 1 und DCT 2), die sich in ihren Transportereigenschaften unterscheiden (Abbildung 1-5 und 1-6) (Obermüller *et al.*, 1995). Neben dem NCCT in der apikalen Membran der DCT 1 Zelle findet man noch den TRPM6, einen Magnesiumkanal, der 2002 identifiziert wurde (Schlingmann *et al.*, 2002; Voets *et al.*, 2004). Erst kürzlich wurde der Kaliumkanal Kir4.1 beschrieben, dieser befindet sich an der basolateralen Seite der Tubuluszelle (Bockenhauer *et al.*, 2009, Scholl *et al.*, 2009). Ein Amilorid-sensitiver epithelialer Natriumkanal (ENaC) sowie ein Calciumkanal (ECaC) werden in der DCT 2 Zelle exprimiert (Loffing *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu Defekten im Bereich des TAL, kommt es bei Mutationen der Transportproteine im DCT nicht zu einer Beeinflussung der Harnkonzentrierung. Der Salzverlust stellt sich in der Regel milder dar.

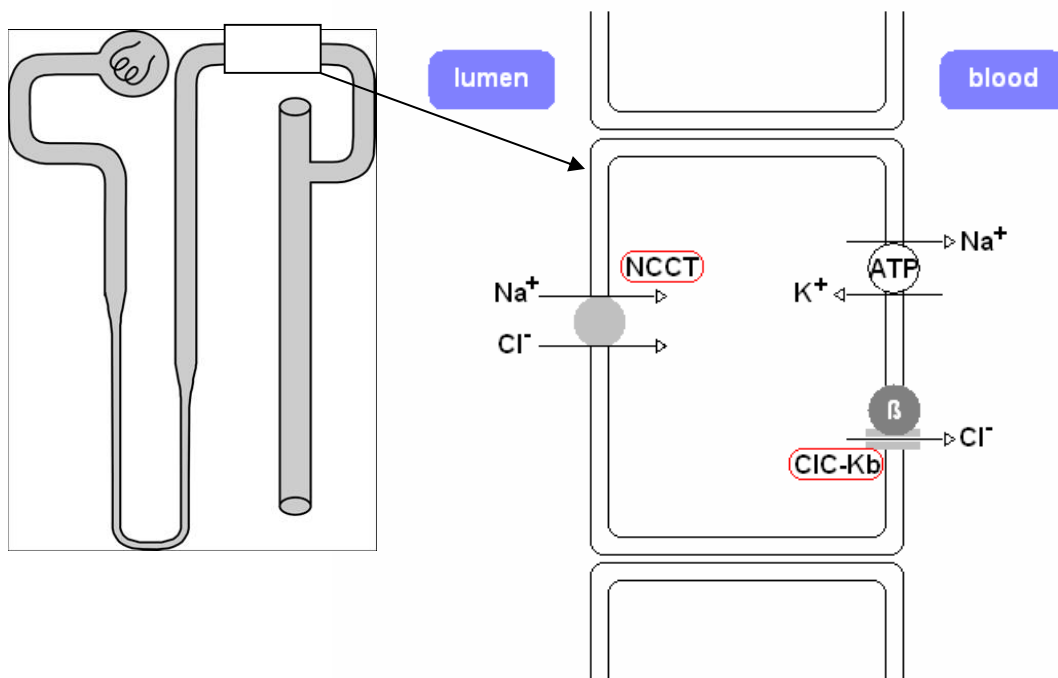


Abbildung 1-4: Modell der transzellulären Transportprozesse entlang des distalen Abschnitts des Nephrons (DCT)

An der luminalen Seite liegt der NCCT, der Natrium und Chlorid gemeinsam in die Tubulusepithelzelle hinein transportiert. An der basolateralen Seite findet man neben der Natriumpumpe einen Chloridkanal (ClC-Kb). Die Pfeile zeigen in die Richtung des Transportes.

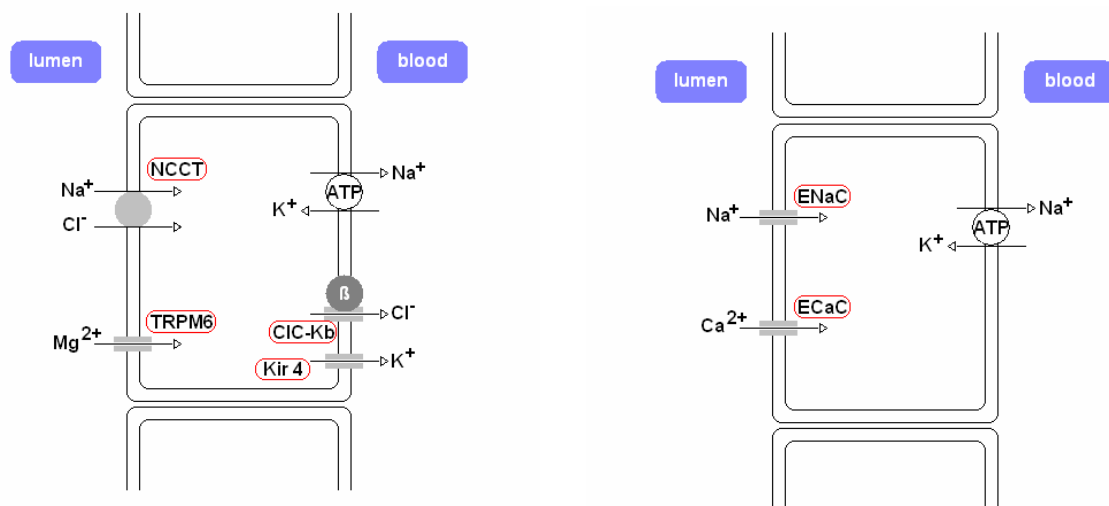


Abbildung 1-5: DCT 1 im distalen Tubulus

Neben den Transportern/Kanälen NCCT, Kir4.1 (Kir 4), ClC-Kb und der Natriumpumpe gibt es in der DCT 1 Zelle noch einen Magnesiumkanal (TRPM6) an der apikalen Membran.

Abbildung 1-6: DCT 2 im distalen Tubulus

In der DCT 2 Zelle findet man neben der Natriumpumpe einen Natrium(ENaC)-und einen Calcium(ECaC)-Kanal an der luminalen Seite.

1.2.3 Konsequenzen des gestörten Transports von Natrium und Chlorid entlang des Nephrons

In den Segmenten TAL und DCT des Nephrons ist die Resorption von Natrium direkt an die Resorption von Chlorid gekoppelt. Aus diesem Grund betrifft ein Defekt der Transportproteine in diesen Bereichen sowohl die Natrium- als auch die Chlorid-Homöostase (Jeck *et al.*, 2005). Während der Natriumverlust durch kompensatorische Steigerung der Reabsorption entlang des distaler gelegenen Aldosteron-sensitiven Nephronabschnittes wieder ausgeglichen werden kann, geht Chlorid irreversibel mit dem Urin verloren, was eine *Hypochlorämie* zur Folge hat. Da der Chloridverlust mit dem Urin eine Steigerung von negativ geladenen Ionen im Urin nach sich zieht, kommt es aufgrund des Ausgleichs der entstehenden elektrischen Differenz zu einem zusätzlichen Verlust von positiv geladenen Kationen wie Ammonium und Kalium. Somit entstehen eine *metabolische Alkalose* und eine *Hypokaliämie*. Der Kaliumverlust wird zusätzlich durch einen sekundären *Hyperaldosteronismus* verursacht. Dieser entsteht dadurch, dass ein geschwächter Natriumtransport eine Abnahme der extrazellulären Flüssigkeit erzeugt, was wiederum zu einer Aktivierung der Reninsekretion und damit auch der Aldosteronsynthese führt.

Deswegen sind Salzverlusttubulopathien aufgrund einer Störung der Transportproteine im TAL und DCT durch eine *Hypochlorämie*, eine *metabolische Alkalose* und eine *Hypokaliämie* charakterisiert. Trotzdem sind sie in ihrer klinischen Ausprägungsform eine sehr heterogene Krankheitsgruppe, abhängig von dem betroffenen Transportprotein. Man unterscheidet das antenatale Bartter Syndrom (aBS), das antenatale Bartter Syndrom mit sensoneuraler Taubheit (BSND), das klassische Bartter Syndrom (cBS) das Gitelman Syndrom (GS) und das SeSAM Syndrom (oder EAST Syndrom) .

1.3 Hereditäre Salzverlusttubulopathien

Zeitgleich mit der Beschreibung der ersten Salzverlusttubulopathien mit hypochlorämischer Alkalose und sekundärer Hypokaliämie wurden die Mechanismen des transepitheliale Ionentransport an einzelnen isolierten Nephronsegmenten aufgeklärt (Royer *et al.*, 1964; Greger, 1985). Zusätzlich wurden in dieser Zeit einzelne Inhibitoren der Transporter identifiziert. Unter ihnen waren Schleifendiuretika und Thiazide, die in der klinischen Praxis schon in Gebrauch waren (Burg *et al.*, 1973; Kunau *et al.*, 1975). All diese Erkenntnisse führten schließlich zur molekularen Identifizierung der Ionentransporter NCCT, NKCC2, ROMK, CLCK und Barttin, als wichtige Voraussetzung zur Differenzierung der Salzverlusterkrankungen (Gamba *et al.*, 1993; Gamba *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1993; Jentsch *et al.*, 1990).

Zum ersten Mal beschrieb Rosenbaum 1957 einen klinischen Fall von einem zwei Monate alten Kind mit kongenitaler hypokalämischer Alkalose, Gedeihstörungen und Dehydratation, welches mit siebeneinhalb Monaten an den Folgen der Erkrankung verstarb (Rosenbaum *et al.*, 1957). Fünf Jahre später charakterisierte Frederic Bartter als erstes ein neues Syndrom. Es war durch kongenitalen tubulären Salzverlust mit Hypokaliämie, metabolischer Alkalose und erhöhtem Aldosteronspiegel bei normalem Blutdruck gekennzeichnet (Bartter *et al.*, 1962). Viele weitere Fälle des Bartter Syndroms (BS) wurden in den folgenden Jahren veröffentlicht (Fanconi *et al.*, 1971; McCredie *et al.*, 1971; McCredie *et al.*, 1974; Rodrigues Pereira *et al.*, 1982). Bei allen waren eine Hypokaliämie, eine Hypochlorämie und eine metabolische Alkalose zu finden, doch unterschieden sie sich in anderen Parametern wie Manifestationsalter, Gedeihstörungen, Prostaglandinsekretion, Calcium-Konzentration im Urin und Auftreten einer Hypomagnesiämie, so dass das BS in der folgenden Zeit klinisch weiter unterteilt werden konnte.

1966 grenzte Gitelman eine Unterform des Bartter Syndroms ab, das Gitelman Syndrom (GS) (Gitelman *et al.*, 1966). Diese milde Variante unterschied sich von den übrigen Bartter Syndromen durch das Auftreten von Tetanien, die durch eine Hypomagnesiämie verursacht wurden (Rodriguez-Soriano *et al.*, 1987). Weitere Untersuchungen zeigten außerdem eine niedrige Urinkonzentration von Calcium (Bettinelli *et al.*, 1992). Erst kürzlich wurde das SeSAM Syndrom (oder EAST Syndrom) beschrieben. Im Gegensatz

zum Gitelman Syndrom kommt es hierbei zusätzlich zur Ausprägung einer Epilepsie, Ataxie und Innenohr-Taubheit (Bockenhauer *et al.*, 2009, Scholl *et al.*, 2009).

Im Gegensatz dazu beobachteten Fanconi und McCredie sehr schwere Verlaufsformen bei Neugeborenen mit einer hohen Calciumurinkonzentration und einer Nephrokalzinose (Fanconi *et al.*, 1971; McCredie *et al.*, 1971). Mit den medizinischen Fortschritten in der Neonatologie und höheren Überlebensraten von Frühgeborenen, konnte der Neonatologe Ohlsson 1984 eine weitere Variante definieren, das antenatale Bartter Syndrom (aBS) (Ohlsson *et al.*, 1984). Es unterschied sich vom klassischen Bartter Syndrom schon pränatal durch die Manifestation eines Polyhydramnions, was zu Frühgeburtlichkeit führte. Diese Form geht außerdem postnatal mit einem erhöhten Risiko einer schwerwiegenden Dehydratation durch eine Polyurie einher. Durch die Therapie mit Indomethacin, einem Prostaglandinsynthese-Inhibitor, konnte das Auftreten von Wachstumsstörungen, Polyhydramnion und Dehydratation erfolgreich behandelt werden (Donker *et al.*, 1977; Konrad *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang entdeckte Seyberth die wichtige Rolle der erhöhten renalen und extrarenalen Prostaglandinproduktion, wodurch er den Namen Hyperprostaglandin E Syndrom (HPS) prägte (Seyberth *et al.*, 1985; Seyberth *et al.*, 1987). Eine weitere Form der antenatalen Form des Bartter Syndroms wurde das erste Mal an fünf Beduinenkindern beschrieben, hierbei wurde neben der schweren Nierenbeteiligung eine sensoneurale Taubheit (SND) beobachtet (Landau *et al.*, 1995).

Zusammenfassend können somit die hypokalämischen Salzverlusttubulopathien durch die klinische Manifestation und laborchemische Untersuchung unterschieden werden (Tabelle 1).

Tabelle 1-1: Klinische Differenzierung der Salzverlusttubulopathien

Erkrankung	Manifestations- alter	Polyhy- dramnion	Polyurie	Nephro- calcinose	Urin Ca ²⁺	Serum Mg ²⁺
Antenatales Bartter Syndrom	pränatal	ja	ja	ja	hoch	normal
Antenatales Bartter Syndrom mit Taubheit	pränatal	ja	ja	nein	niedrig- normal	niedrig- normal
Klassisches Bartter Syndrom	Säugling – frühe Jugend	selten	selten	selten	normal	niedrig- normal
Gitelman Syndrom	Jugend	nein	selten	nein	niedrig	niedrig
SeSAM- Syndrom (EAST-Syndrom)	Säugling	nein	nein	nein	niedrig	niedrig

1996 konnten Simon und seine Arbeitsgruppe bedeutende Erkenntnisse durch die Charakterisierung der Gene erlangen, die für bestimmte Transportproteine kodieren, und Mutationen identifizieren, die für die verschiedenen Salzverlustkrankheiten verantwortlich sind (Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 12); Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 13); Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 14); Simon *et al.*, 1997). Anhand von molekulargenetischen Analysen des antenatalen Bartter Syndroms konnten Defekte der Transportproteine NKCC2 und ROMK entlang des TAL für die Erkrankung verantwortlich gemacht werden (Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 13); Simon *et al.*, 1996

(Nat Genet 14)). Das klassische Bartter Syndrom ist durch eine Dysfunktion des ClC-Kb verursacht (Simon *et al.*, 1997), der entlang des TAL und des DCT zu finden ist. Das Gitelman Syndrom hingegen wird durch einen Funktionsverlust des NCCT im DCT hervorgerufen (Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 12)).

Aus einer Störung von der beta-Untereinheit Barttin der Chloridkanäle oder beider Chloridkanäle (ClC-Ka und ClC-Kb) gemeinsam resultiert das antenatale Bartter Syndrom mit sensorischer Taubheit (Birkenhäger *et al.*, 2001; Schlingmann *et al.*, 2004). Birkenhäger und seine Arbeitsgruppe identifizierten 2001 erstmalig ein neues Gen (*BSND*), welches für die beta-Untereinheit Barttin kodiert (Birkenhäger *et al.*, 2001). Zur selben Zeit konnten zwei Arbeitsgruppen die entscheidende Rolle von der beta-Untereinheit Barttin für die Funktion des ClC-K Chloridkanal demonstrieren (Estevez *et al.*, 2001; Waldegger *et al.*, 2002). Durch einen Funktionsverlust des Kaliumkanal Kir4.1 im DCT resultiert das SeSAM Syndrom (Bockenhauer *et al.*, 2009, Scholl *et al.*, 2009). (Tabelle 2)

Tabelle 1-2: Gene und Genprodukte, die ursächlich an den Salzverlusttubulopathien beteiligt sind

Erkrankung	Genlocus	Gen	Protein	Tubulussegment
Antenatales Bartter Syndrom	15q15-21	SLC12A1	NKCC2	TAL
	11q24	KCNJ1	ROMK	TAL
Antenatales Bartter Syndrom mit SND	1q36	CLCNKA/B	ClC-Ka/b	TAL/DCT
	1q31	BSND	Barttin (Cl ⁻ Kanal Untereinheit)	TAL/DCT
Klassisches Bartter Syndrom	1q36	CLCNKB	ClC - Kb	TAL/DCT
Gitelman Syndrom	16q13	SLC12A3	NCCT	DCT
SeSAM Syndrom	1q22	KCNJ10	Kir 4.1	DCT

Im Folgenden werden die verschiedenen Syndrome eingehender dargestellt mit besonderem Augenmerk auf das Gitelman Syndrom.

1.3.1 Das antenatale Bartter Syndrom (Hyperprostaglandin E Syndrom)

Das aBS oder HPS ist eine schwere Form der renalen Salzverlustkrankheiten. Bereits im zweiten Trimenon entwickelt sich durch fetale Polyurie ein Polyhydramnion mit erhöhter Cl^- -Konzentration im Fruchtwasser (Massa *et al.*, 1987; Proesmans *et al.*, 1987). Zudem führt es zu Frühgeburtlichkeit zwischen der 27. und 35. Schwangerschaftswoche (Proesmans, 1997). Im Neugeborenenalter kommt es zu einer ausgeprägten Polyurie und damit zu einer lebensbedrohlichen Hypovolämie, die häufig zuerst an einen Diabetes insipidus denken lässt, sich aber durch eine Urinosmolalität über 160 mosmol/kg von diesem unterscheidet. Trotz der kompensatorisch gesteigerten Natriumchloridückresorption entlang des distalen Tubuluses entwickeln die Neugeborenen einen lebensbedrohlichen Salzverlust, der eine Hyponaträmie und eine *Hypochlorämie* verursacht. Der Natriumverlust geht in den nächsten Tagen zurück, während dafür der Kaliumverlust ansteigt, was man auch als Na^+ - K^+ switch bezeichnet (Reinalter *et al.*, 1998). Außerdem entwickelt sich, hervorgerufen durch die verminderte Na^+ -Konzentration, eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), was die Sekretion von H^+ und K^+ steigert, wodurch eine *hypokalämische Alkalose* entsteht. Mit den weiteren Lebensmonaten entwickeln die Patienten aufgrund einer erhöhten Calcium-Konzentration im Urin zusätzlich eine medulläre Nephrokalzinose (Proesmans 1997).

1.3.2 Das antenatale Bartter Syndrom mit Innenohr-Taubheit

Das antenatale Bartter Syndrom mit sensoneuraler Taubheit ähnelt in seinem klinischen Erscheinungsbild sehr dem aBS, ist jedoch zusätzlich durch eine Innenohrschwerhörigkeit gekennzeichnet. Es entwickelt sich aufgrund einer Störung des Chloridtransportes, welche durch Mutationen in den Genen entsteht, die entweder für die beta-Untereinheit Barttin oder für beide Chloridkanäle (ClC-Ka und ClC-Kb) kodieren. Barttin findet man in jedem ClC-K exprimierenden Nephronsegment und ist somit wichtig für die Funktion der Chloridtransporter entlang des TAL und des DCT. In dem Zusammenhang ist verständlich, dass bei Defekten der beta-Untereinheit oder

beider Chloridkanäle schwerste Fälle von Polyhydramnion, Polyurie und Salzverlusten beschrieben werden, da beide Abschnitte des Tubulussystems (TAL und DCT) betroffen sind und keine kompensatorische Aktivierung im nicht defekten Teil stattfinden kann. Für eine schwerere Verlaufsform spricht außerdem das schlechte Ansprechen auf die Therapie mit Indomethacin. Die Patienten entwickeln häufig ein Nierenversagen (Jeck *et al.*, 2001 (Pediatrics)).

1.3.3 Klassisches Bartter Syndrom

Ein isolierter Ausfall des ClC-Kb Chlorid-Kanals führt zu dem klassischen Bartter Syndrom. Studien haben gezeigt, dass diese Form extrem variable Krankheitsverläufe aufweist, die aber in ihrer Stärke der Ausprägungsform nicht bestimmten Mutationen im CLCNKB-Gen zugeordnet werden können (Konrad *et al.*, 2000; Zelkovic *et al.*, 2003). Das Manifestationsalter reicht von pränatal bis ins frühe Jugendalter. Nur bei ungefähr einem Fünftel der Fälle kann ein Polyhydramnion beobachtet werden (Peters *et al.*, 2002). Klinisch zeigen sich unterschiedliche Symptome wie Gedeihstörungen, Muskelschwäche, Müdigkeit und Spasmen. Laboruntersuchungen ergeben die typische Konstellation von *Hypochlorämie*, *Hypokaliämie*, *metabolischer Alkalose* und einer erhöhten RAAS-Aktivität. Bei dem Großteil der Patienten entwickelt sich keine Hyperkalziurie, so dass in dem Zusammenhang mit dem klassischen Bartter Syndrom auch meistens keine Nephrokalzinose festgestellt wird.

1.3.4 SeSAM Syndrom

Als Abgrenzung zum Gitelman Syndrom wurde das SeSAM Syndrom (oder EAST Syndrom) erst kürzlich von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Es ist durch eine Epilepsie, Ataxie, Sensoneuronale Taubheit und Tubulopathie mit *Hypokaliämie*, *metabolischer Alkalose* und *Hypomagnesämie* charakterisiert. Durch eine Mutation des KCNJ10 Gens kommt zu einem Funktionsverlust des Kaliumkanals Kir 4.1, der im

distalen Tubulus der Niere exprimiert wird (siehe Abbildung 1-6). (Bockenhauer *et al.*, 2009, Scholl *et al.*, 2009). Vermutet wird, dass dieser dort basolateral exprimierte Kaliumkanal an der Kalium-Rezirkulation über die Na-K-ATPase beteiligt ist, und somit die Aktivität dieses Transporters beeinflusst. Mit Funktionsverlusten assoziierte Mutationen stören somit die von der Na-K-ATPase abhängigen Transportprozesse des distalen Konvoluts. Ähnliche Störungen werden für das Innenohr und Gliazellen, die ebenfalls Kir4.1 exprimieren, diskutiert.

1.3.5 Gitelman Syndrom

Mutationen im SLC12A3 Gen führen durch einen Funktionsverlust des NCCT im DCT zum Gitelman Syndrom. Jeck *et al.* konnte zeigen, dass der Phänotyp eines GS auch gelegentlich durch eine Mutation im Gen des CLC-Kb bedingt sein kann (Jeck *et al.*, 2000). Das Gitelman Syndrom ist die mildeste Form der BS. Ein Polyhydramnion oder eine neonatale Manifestation kann man normalerweise nicht beobachten, vielmehr sind die meisten Patienten bei Erstdiagnose über sechs Jahre alt und in vielen Fällen schon im frühen Erwachsenenalter (Monnens *et al.*, 1998; Knoers *et al.*, 2008). Die Patienten sind häufig asymptomatisch oder zeigen eine Vielfalt unspezifischer Symptome wie Salzhunger, Muskelkrämpfe, Muskelschwäche, abdominalem Schmerz, Erbrechen, Fieber, Wachstumsstörungen oder Herzrhythmusstörungen (Bettinelli *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2001 (Kidney Int)). Fälle von Chondrokalzinose mit geschwollenen und schmerzhaften Gelenken wurden beschrieben (Calo *et al.*, 2000; Gascon *et al.*, 1999). Bettinelli fand bei 40% der Gitelman Patienten, die er untersuchte, eine QT-Verlängerung im EKG (Bettinelli *et al.*, 2002).

Biochemisch ist das GS wie die anderen BS durch eine *hypokaliämische metabolische Alkalose* gekennzeichnet. Im Gegensatz zu der Hypercalciurie, die bei den anderen Bartter Syndromen beobachtet wird, besteht praktisch immer eine *Hypocalciurie* (Bettinelli *et al.*, 1992). Die daraus resultierende Abnahme der Calciumausscheidung könnte die Chondrokalzinose erklären. Klinische Beobachtungen zeigten, dass die Gitelman Patienten abhängig vom Geschlecht, Alter, Knochenmetabolismus und Magnesiumaufnahme sehr individuelle variable Calciumurinkonzentrationen trotz der

gleichen Mutation aufweisen können (Lin *et al.*, 2004). Außerdem beobachtet man typischerweise eine *Hypomagnesämie*, wodurch die Muskelbeschwerden und Tetanien begründet werden können (Ring *et al.*, 2002). Die Elektrolytstörungen in Kombination begünstigen das Auftreten von Herzrhythmusstörungen.

Bis heute sind die Mechanismen, die zu Hypomagnesämie und Hypokalziurie führen, noch immer nicht vollständig aufgeklärt. Denkbar wäre eine im Rahmen einer gestörten DCT1-Funktion auftretende kompensatorische Überfunktion des DCT2-Segmentes. Während erstere den Salz- und Magnesium-Verlust erklärt, würde letztere über eine gesteigerte Calcium-Resorption eine Erklärung für die Hypokalziurie liefern (s. Abbildung 1-5 und 1-6).

1.3.5.1 Der Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCCT) und das SLC12A3-Gen

Das Gitelman Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Es resultiert aus einer Mutation im SLC12A3-Gen, welches auf Chromosom 16q13 zu finden ist (Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 12); Lemmink *et al.*, 1996; Mastroianni *et al.*, 1996). Das SLC12A3-Gen gehört zu einer Gen-Familie, die für Salztransportproteine vom Typ 12 kodieren (SLC12). Bei Säugetieren sind drei verschiedene Gene bekannt (SLC12A1, SLC12A2, SLC12A3), die für NaCl-Transporter kodieren, welche alle wie der NCCT aus 12 transmembranären Domänen und einem intrazellulären Amino(NH₂)-und Carboxy(COOH)-terminus bestehen (Abbildung 1-7) (Delpire *et al.*, 1996; Lemmink *et al.*, 1998, Kunchaparty *et al.*, 1999). Der NCCT wird, wie oben erwähnt, im distalen Tubulus der Niere an der apikalen Membran exprimiert und besteht aus 1021 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 112kD. Das Gitelman-Syndrom resultiert folglich aus einem Funktionsverlust des NCCT NaCl-Cotransporters. Eine dem Gitelman-Syndrom nahezu inverse Erkrankung stellt das Gordon-Syndrom dar. Diese Erkrankung manifestiert sich mit Bluthochdruck bei Volumenexpansion, hyperchlorämischer metabolischer Azidose, Hyperkaliämie und Hyperkalziurie (Gordon *et al.*, 1970; Paver *et al.*, 1964). Die ausgesprochene Sensitivität des Bluthochdruckes bei Gordon-Syndrom Patienten auf Thiazid-Diuretika legt eine Überfunktion des NCCT NaCl-Cotransporters als molekulare Grundlage dieser Erkrankung nahe. Die

Entschlüsselung der genetischen Ursache zeigte die Beteiligung von verschiedenen WNK Protein-Kinasen (WNK1 und WNK4), deren Aktivität in der Tat die Transportaktivität des NCCT-Proteins zu beeinflussen scheint (Kahle *et al.*, 2008; Flatman, 2008). Während die WNK4 den Transporter direkt inhibiert, unterdrückt die WNK1 die Inhibition der WNK4 des Transporters und wirkt dadurch indirekt aktivierend auf den NCCT (Yang *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2005).

1.3.5.2 Mutationen und Polymorphismen des NCCT

Bis zu dem heutigen Zeitpunkt sind über 140 verschiedene Mutationen im SLC12A3-Gen bekannt, die sich auf der gesamten Länge des Gens erstrecken (Knoers *et al.*, 2008; Reissinger *et al.*, 2002). Da die Erkrankung autosomal rezessiv vererbt wird, handelt es sich entweder um homozygote oder kombiniert heterozygote Mutationen. Es gibt nonsense, frameshift, splice site und missense Mutationen, die alle im Zusammenhang mit dem Gitelman Syndrom entdeckt worden sind (Simon *et al.*, 1996 (Nat Genet 12); Mastroianni *et al.*, 1996). Bisher konnte noch keine zuverlässige Genotyp-Phänotyp-Korrelation nachgewiesen werden (Rivera-Munoz *et al.*, 2007).

Es sind auch Polymorphismen des Gens bekannt, welche Sequenzvariationen sind, die häufiger als 1% eines gesunden Kollektivs auftreten und zu keiner sichtbaren Krankheitsausbildung führen. Interessanterweise wurde beschrieben, dass heterozygot auftretende Funktions-Verlust Mutationen des SLC12A3-Gens den klinisch asymptomatischen Träger vor der Entstehung eines Bluthochdrucks schützt (Ji *et al.*, 2008).

1.3.5.3 Funktionelle Untersuchungen von Mutationen des NCCT

Um die Auswirkung der in Zusammenhang mit dem Gitelman-Syndrom beobachteten Mutationen des NCCT-Proteins auf dessen Aktivität zu untersuchen, bedienten sich bereits verschiedene Arbeitsgruppen der funktionellen Expression des NCCT-Proteins

in Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* (Tabelle 1-3) (Kunchaparty *et al.*, 1999; De Jong *et al.*, 2002; Sabath *et al.*, 2004). Das Expressionssystem hat gezeigt, dass es ein hervorragendes Instrument für reproduzierbare Versuche mit dem NCCT ist (Gamba *et al.*, 1994; Monroy *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2003). Zum ersten Mal analysierten Kunchaparty und seine Arbeitsgruppe die Funktion mehrerer missense Mutationen des NaCl-Transporters mittels Western Blot Analysen, Immunfluoreszenz und Na⁺-Uptakes. Die Untersuchungen ergaben, dass die Proteine zwar synthetisiert, jedoch nicht glykosyliert worden sind und somit zu einer funktionellen Inaktivität führten. Außerdem konnte das mutierte Protein nicht in der Plasmamembran dargestellt werden (Kunchaparty *et al.*, 1999). Der Funktionsverlust wurde somit durch die nicht stattgefundene Glykosylierung erklärt. Diese Ergebnisse wurden von Hoover *et al.* unterstützt (Hoover *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu fand De Jong mutierte glykosylierte Proteine, bei denen eine Restaktivität nachgewiesen werden konnte. Diese Mutationen konnten außerdem in der Plasmamembran angefärbt werden (De Jong *et al.*, 2002). Eine weitere Studie stellte einen Zusammenhang zwischen der Restaktivität und dem Einbau in die Membran dar, mit dem Resultat, dass die verminderte Insertion in die Plasmamembran Hauptgrund für die Funktionsabnahme des Transporters war (Sabath *et al.*, 2004).

Tabelle 1-3: Zusammenfassung bisher untersuchter Mutationen des NCCT beim GS
 Zusammengetragene Daten aus drei verschiedenen Studien zur funktionellen Analyse von Mutationen des NCCT. Es beinhaltet die Ergebnisse der Funktion, der Glykosylierung und der Lokalisation (Plasmamembran (PM); Cytoplasma (CP)) des NCCT.

Mutation	Funktion	Glykosylierung	Lokalisation des NCCT
WT	Ja (100%)	Ja	PM
R206W	Nein	Nein	Nicht untersucht
L215P	Restaktivität	Ja	PM+CP
P346L	Nein	Nein	Nicht untersucht
C418R	Nein	Nein	Nicht untersucht
G439S	Nein	Nein	CP
F536L	Restaktivität	Ja	PM+CP
A585V	Restaktivität (6,2%)	Ja	PM (reduziert)
G610S	Restaktivität (12,7%)	Ja	PM (reduziert)
G627V	Restaktivität (66,5%)	Ja	PM (reduziert)
T649R	Nein	Nein	CP
L735R	Nein	Nein	Nicht untersucht
G738R	Nein	Nein	Nicht untersucht
G741R	Nein	Nein	CP
R935Q	Restaktivität (36,5%)	Ja	PM (reduziert)
R955Q	Restaktivität	Ja	PM+CP
G980R	Restaktivität	Ja	PM+CP
C985Y	Restaktivität	Ja	PM+CP
R989X	Nein	Nein	CP
V995M	Restaktivität (32,5%)	Ja	PM (reduziert)

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte *in vitro* untersucht werden, in wie fern neue Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) des NCCT, die bei Gitelman Patienten gefunden worden sind, Eigenschaften des NCCT-Proteins sowohl in Hinblick auf dessen Transportaktivität als auch dessen Einbau in die Zellmembran beeinflussen. Das Interesse galt vor allem dem Nachweis möglicher Restaktivitäten. Die Mutationen verteilen sich auf die gesamte Länge des Proteins (Abbildung 1-7). Außerdem sollten zusätzlich Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C) auf ihre Auswirkungen auf die NCCT-Funktion getestet werden. Die Frage war, ob sie wirklich Wildtyp-ähnliche Funktion zeigen oder doch zu einer Aktivitätsänderung führen (Abbildung 1-7). Für die Versuche wurde ein Flag-Epitop benutzt, welches am Aminoende eingefügt wurde, um Antikörperreaktionen für Wester Blot Versuche und Immunfluoreszenzdarstellungen möglich zu machen (Abbildung 1-7). Vorherige Studien haben gezeigt, dass das Epitop nicht in die Funktion des Transporters eingreift (De Jong *et al.*, 2002).

Mittels des Expressionssystems des Südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* sollten der Wildtyp-NCCT, die Mutationen und die Polymorphismen exprimiert werden und mit Hilfe von radioaktiven Cl⁻-Uptake-Messungen die Chloridaufnahme der Transporter dargestellt werden. Die Werte des Wildtyps sollten anschließend mit den Werten der Mutanten und der Polymorphismen verglichen werden.

Das Interesse konzentrierte sich schließlich auf Versuche zur Klärung der Mechanismen des Funktionsverlustes der mutierten Transporter. Einer der möglichen Gründe für den Aktivitätsverlust ist die Beeinträchtigung der Proteinsynthese oder der Proteinstabilität, was durch Western Blot Untersuchungen dargestellt werden sollte. Eine weitere Möglichkeit des Funktionsverlustes stellt eine gestörte Oberflächenexpression des Transporters dar. Hierfür sollten Immunfluoreszenzfärbungen an Oozytenschnitten weitere Hinweise geben. Schließlich wurde noch eine Störung der funktionellen Regulation in Betracht gezogen. Um diese zu testen, sollten weitere Cl⁻-Uptakes angefertigt werden, bei welchen neben dem WT-NCCT zusätzlich WNK1 Protein Kinase koinjiziert wurde.

Zuletzt sollte geprüft werden, ob mit den erhobenen Daten eine Korrelation zwischen der in vitro Aktivität des Transporters und des klinischen Phänotyps besteht.

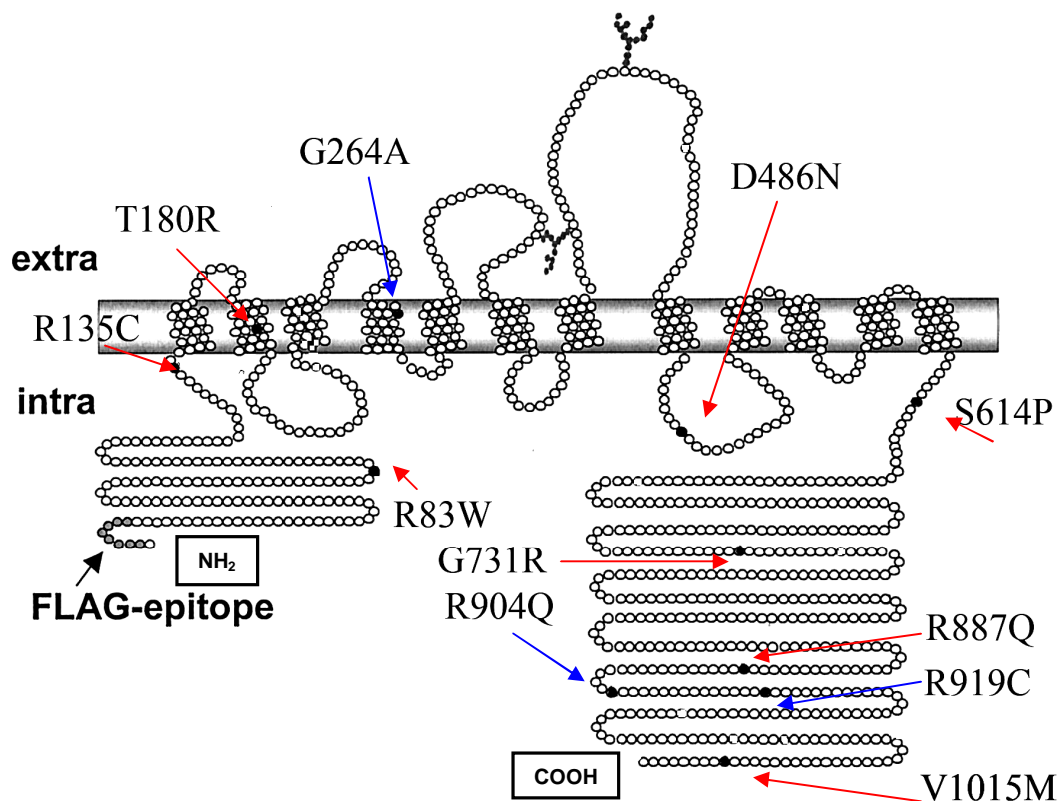


Abbildung 1-7: Modell des NCCT mit den zu untersuchenden Mutationen (rot) und Polymorphismen (blau)

In dem Modell zeigt sich der NCCT mit 12 transmembranären Domänen und einem intrazellulären Amino(NH₂)-und Carboxy(COOH)-terminus. Die roten Pfeile markieren die Lage der zu untersuchenden Mutationen und die blauen Pfeile die Polymorphismen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav:	„3870 ELV“ (SYSTEC, www.systec.lab.de)
Bakterien-Schüttler:	Schüttelinkubator 3032 (GFL, www.gfl.de)
Brutschrank:	Wärme-&Trockenschrank „UT 12 – Function line“ (Heraeus Instruments, www.heraeus-imstruments.com)
Elektrophorese-System:	„Multiphor II“ (AmershamBiosciences, www.amershambiosciences.com)
Elektroporator:	Elektroporator „Cell-Porator“ (Invitrogen, www.invitrogen.com)
Gelkammern:	Gelelektrophorese-Kammer „GNA 100“ (AmershamBiosciences, www.amershambiosciences.com)
Heizblock:	Blockthermostat „neoBlock-Heizer Mono I“ (NeoLab, www.neolab.de)
Heizplatte:	Heizplatte mit Magnetrührer „RCT Basic“ (IKA Werke, www.ika.de)
Immunfluoreszenzmikroskop:	Leica DMRB (Leica, www.leica-microsystems.com)
Kamera:	RT color (Visitron Systems, www.visitron.de)
Kaltlichtleuchte:	„KL750“ (Schott, www.schott.com)
Kontaminationsmonitor:	“LB 122” (Berthold Technologies, www.bertholdtech.com)
Kryotom:	CM 1900

	(Leica, www.leica-microsystems.com)
Kühlschrank und Schüttler:	“Innova 4230” (New Brunswick Scientific Co., Inc., www.nbsc.com)
Küvetten:	Küvetten 0, 2 cm (Bio-Rad Laboratories, www.bio-rad.com)
Küvettenständer:	„Safety Stand 630 RB-1“ (BTX, www.btxonline.com)
Low Voltage Power Supply:	„Standard Power Pack 25“ (Biometra, www.biometra.de)
Mikroskop:	Stereomikroskop „MBS-10“ (Lomo Optics Inc., www.lomooptics.com)
Mikrospritze:	Hamilton (Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz)
Mini-Vakuumpumpe:	“Laboport” (NeoLab, www.neolab.de)
Nanoliter-Injektor:	“Nanoliter 2000” (World Precision Instruments, www.wpiinc.com)
PCR-Maschine:	Thermocycler „GeneAmp PCR System 2400“ (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com) Thermocycler „GeneAmp PCR System 9600” (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com)
pH-Meter:	„MP 220“ (METTLER TOLEDO, www.mt.com)
Photometer:	Photometer „GeneQuant™ II – RNA/DNA Calculator” (Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
Pipetten:	„Pipetman – P2, P10, P20, P200, P1000“ (GILSON, www.gilson.com)
Pipettierhilfe:	„pipetus Akku“ (HIRSCHMANN, www.hirschmann-laborgeraete.de)
Pull-Gerät:	Puller „PUL-1“ (World Precision Instruments, www.wpiinc.com)
Reinwassersystem:	“Ultra-Clear”

	(SG Wasseraufbereitungs-/Regenerierstation GmbH, www.sgwater.de)
Schüttelinkubator:	Schüttelinkubator 3032 (GFL, www.gfl.de)
Sequenzierer:	Sequenzierer "ABI Prism 310 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com)
Sterilwerkbank:	Sicherheitswerkbank "HERAsafe HS" (Heraeus Instruments, www.heraeus-instruments.com)
Szintillationszähler:	"LS1701" (Beckmann, München)
UV-Transluminator:	"TFX-20M" (Labortechnik Fröbel GmbH, www.ctlindau.de)
Vakuum-Trockner:	Vakuumtrockner "DNA-plus" (Thistle Science, www.thistlescientific.co.uk)
Vortex:	Reagenzglasmixer „Vortex“ (NeoLab, www.neolab.de)
Waage:	Präzisionswaage mit Unterflur-Wägeeinrichtung (NeoLab, www.neolab.de)
Wärme- und Trockenschrank:	"UT12-Function line" (Heraeus Instruments, www.heraeus-instruments.de)
Wasserbad:	B Lauda (Otto E. Kobe KG, Marburg)
Wippe:	„WT16“ (Biometra, www.biometra.de)
Western blotting System:	Bio Rad System „RPN 2132“ (Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
X - Ray - Cassette:	Rego (Rego, www.radiologie-zubehoer.de)
Zentrifugen:	Mikroliterzentrifuge „Biofuge fresco“ (Heraeus Instruments, www.heraeus-instruments.de) Universalzentrifuge „Varifuge 3,0 RS“ (Heraeus Instruments, www.heraeus-instruments.de)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Aufbewahrungsschale:	„cellstar“ 6-well-plates / 24-well-plates (Greiner bio-one, www.greinerbioone.com)
Falcontubes:	„cellstar“ 15ml / 50 ml (Greiner bio-one, www.greinerbioone.com)
Film:	Hyperfilm ECL (Amersham Bioscience, www.amershambioscience.com)
Filter:	Blotting - Papier (Scheicher & Schuell GmbH, Dassel)
Glaskapillare:	3,5nl (World Precisions Instruments, www.wpiinc.com)
Latex-Einmalhandschuhe:	„safeskin“ (Kimberly-Clark Professional, www.kcprofessional.com)
Nahtmaterial:	„Prolene 5-0“ (Ethicon, www.ethicon.de)
Nitrozellulosemembran:	Hyborid-C Extra (Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
Objektträger:	Marienfeld (Marienfeld, www.marienfeld-superior.com)
PCR-Cups:	PCR-Softtubes 0,2ml (Bioenzym Diagnostik GmbH, www.biozym.com)
Petrischalen:	„cellstar“ Gewebekulturschale (Greiner bio-one, www.greinerbioone.com)
Pipetten:	„4878 – 3,5nl, 1,0mm“ (World Precision Instruments, www.wpiinc.com)
Pipettenspitzen:	„Tip-one 10 µl / 200µl / 1000µl“ (Starlab-Products, www.starlab.de)
Polaroidfilme:	Hyperfilm (AmershamBiosciences, www.amershambioscience.com)
Reaktionsgefäße:	“Safe-Lock-Tubes” 1,5ml / 2ml (Eppendorf, www.eppendorf.com)

Röhren-Tubes:	5ml (Sarstedt, www.sarstedt.com)
Sequenziertube:	„Genetic Analyzer“ 0,5ml mit Septum (Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com)
Sterile Stabpipetten:	2ml / 5ml / 10ml / 20ml „cellstar“ (Greiner bio-one, www.greinerbioone.com)
Szintillationsröhrchen:	Miniature 6ml Polyethylene vials (Perkin Elmer, www.perkinelmer.com)
Wägeschälchen:	Wägeschälchen (Otto E. Kobe KG, Marburg)

2.1.3 Chemikalien / Reagenzien / Substanzen

Acrylamid	(Sigma, www.sigma.com)
Agar-Agar	(Gibco BRL, www.invitrogen.com)
Agarose “Seakem LE”	(Cambrex, www.cambrex.com)
3-Aminobenzoessäureethylestermethansulfanat – Narkotikum	(Sigma, www.sigma-aldrich.com)
Ammoniumpersulfat	(Sigma, www.sigma.com)
Ampicillin	(Sigma, www.sigma.com)
Aqua ad iniectabilia	(Baxter, www.baxter.com)
BME (beta-Mecaptoethanol)	(Sigma, www.sigma.com)
Bovines Serum-Albumin	(New England BioLabs, www.neb.com)
Calciumacetat	(Sigma, www.sigma-aldrich.com)
CaCl ₂	(J.T. Baker, www.baxter.com)
³⁶ Chlorid	(Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
Collagenase	(Sigma, www.sigma.com)
Complete	(Roche, www.roche-applied-science.com)
DMSO	(Sigma, www.sigma.com)
dNTP	(Stratagene, www.stratagene.com)
Ethanol (70%/80%/100%)	(Roth, www.carl-roth.com)

Ethidiumbromid	(Sigma, www.sigma.com)
Gentamycin	(Sigma, www.sigma.com)
Glucose	(Sigma, www.sigma.com)
Glycerol	(Riedel-de Haën, www.riedeldehaen.com)
Glycerolgelatine	(Sigma, www.sigma.com)
Glycin	(Sigma, www.sigma.com)
HEPES	(Roth, www.carl-roth.com)
Isopropanol	(Riedel-de Haën, www.riedeldehaen.com)
Kaliumchlorid	(Roth, www.carl-roth.com)
Kaliumhydroxid	(J.T. Baker, www.mallbaker.com)
Loading-Buffer	(Invitrogen, www.invitrogen.com)
Magermilch	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
Magnesiumacetat	(Riedel-de Haën, www.riedeldehaen.com)
Magnesiumchlorid	(Sigma, www.sigma.com)
Magnesiumsulfat	(Sigma, www.sigma.com)
Methanol	(Riedel-de Haën, www.riedeldehaen.com)
Mineralöl	(Sigma, www.sigma.com)
Natriumacetat	(Roth, www.carl-roth.com)
Natriumaspartat	(Sigma, www.sigma.com)
Natriumchlorid	(Riedel-de Haën, www.riedeldehaen.com)
Natriumpyruvat	(Sigma, www.sigma.com)
Normal Goat Serum	(DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
Paraformaldehyd	(Sigma, www.sigma.com)
Pfu-Puffer	(Stratagene, www.stratagene.com)
Rainbow Marker	(Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
SDS	(Sigma, www.sigma.com)
Szintilationsflüssigkeit	(Roth, www.carl-roth.com)
TEMED	(Amersham Biosciences, www.amershambioscience.com)
Template-Suppression-Reagent	(Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com)
Theophyllin	(Sigma, www.sigma.com)
TissueTek	Sakura, www.sakuraeu.com)
Tris Base	(Roth, www.carl-roth.com)

Tris HCl	(Roth, www.carl-roth.com)
TRIS-Puffer	(Roth, www.carl-roth.com)
1% Triton x - 100	(Sigma, www.sigma.com)
Tryptone (Peptone)	(Sigma, www.sigma.com)
Tween	(Roth, www.carl-roth.com)
Yeast Extract "Bacto"	(Becton, Dickinson&Co., www.bd.com)

2.1.4 Hergestellte Puffer & Lösungen

2.1.4.1 Für Oozytenpräparation

10x OR2:

NaCl	825mM	58,44(MG)	96,43g/2l
KCl	20mM	74,56(MG)	2,98g/2l
MgCl ₂	10mM	203,30(MG)	4,07g/2l
HEPES	50mM	238,00(MG)	23,80g/2l

Auf pH 7,5 einstellen.

10x ND96:

NaCl	960mM	58,44(MG)	112,20g/2l
KCl	20mM	74,56(MG)	2,98g/2l
CaCl ₂	18mM	147,02(MG)	5,29g/2l
MgCl ₂	10mM	203,30(MG)	4,07g/2l
HEPES	50mM	238,00(MG)	23,80g/2l

Auf pH 7,5 einstellen.

1x ND96 – Aufbewahrungslösung:

1x ND96	(1:10 aus 10x ND96)
2,5mM Na-Pyruvat	(1:1000 aus 2,5M-Stock)
90mg/l Theophyllin	

1ml 20µg/ml Gentamycin (1:1000 aus 20mg/ml-Stock)

1x ND96 – Chlorid-frei:

Natriumaspargat	173,11(MG)	96mM 16,62g/1l
Kaliumhydroxid	56,11(MG)	2mM 112,22mg/1l
Calciumacetat	158,2(MG)+8,64% H ₂ O	1,8mM 309,37mg/1l
Magnesiumacetat	214,45(MG)	1mM 214,45mg/1l
HEPES	238,00(MG)	5mM 1,19g/1l

Collagenaselösung:

Collagenase	40mg
1xOR2 (1:10 aus 10xOR2)	20ml

2.1.4.2 Für Mutagenesen

Pfu-10xPuffer:

KCl	100mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100mM
Tris-HCl pH 8.8	200mM
MgSO ₄	20mM
1% Triton X-100	
nukleasefreies bovines Serumalbumin	1mg/ml

SOC-Medium:

Tryptone (Peptone)	20g
Yeast Extrakt	5g
Natriumchlorid	0,5g
Magnesiumchlorid (1M)	10ml
Magnesiumsulfat (1M)	10ml
Glucose 20%	20ml
Aqua	ad 1l

Luria Bertani (LB)-Medium:

Tryptone	10g
Yeast Extrakt	5g
Natriumchlorid	5g
Aqua	ad 1l
mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	

LB-Platten mit Ampicillin:

LB-Medium	500ml
Agar-Agar	15g

mit dem Rührfisch in Lösung bringen und autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen, anschließend 5ml Ampicillin hinzufügen und die Platten unter der Sterilwerkbank ausgießen.

2.1.4.3 Für Western Blot

Lysispuffer:

150 mM NaCl
20 mM TRIS pH 7,6
1% Triton x 100%

SDS Sample Puffer :

20% SDS	5,75ml
3M TRIS pH 6,8	1,04ml
Glycerol	5,0ml
Bromphenolblau	0,2g
mit H ₂ O auf 10ml auffüllen	

Trenngel:

Acrylamid	1,35ml
1,5M TRIS pH 8.8	1,25ml
H ₂ O	2,35ml
10% SDS	50µl
10% APS	50µl
TEMED	3,35µl

Sammelgel:

Acrylamid	0,33ml
0,5M TRIS pH 6,8	0,48ml
H ₂ O	1,13ml
10% SDS	20µl
10% APS	20µl
TEMED	1,35µl

10 x Laufpuffer:

Tris Base	60g
Glycin	100g
SDS	10g
mit H ₂ O auf 1l auffüllen	

10 x Transferpuffer:

Tris Base	30,29g
Glycin	150,14g
mit H ₂ O auf 1l auffüllen	

1 x Transferpuffer:

10 x Transferpuffer	100ml
Methanol abs.	200ml
mit H ₂ O auf 1l auffüllen	

10 x TBS:

25,1g Tris HCL

10,9g Tris Base

73,1g NaCl

mit H₂O auf 1l auffüllen und pH 7,5 einstellen1 x TTBS:

1 x TBS mit 0,05% Tween

Stopplösung:

5g Magermilchpulver

mit TTBS auf 100ml auffüllen

2.1.4.4 Für Immunfluoreszenz

10 x PBS:

NaCl 80g

KCl 2g

Na₂HPO₄ 14,4gKH₂PO₄ 2,4gmit H₂O auf 1l auffüllen und pH 7,4 einstellenBlockierungslösung:

Normal Goat Serum 10ml

BSA 0,2g

Triton x-100 0,3ml

10 x PBS 10ml

mit H₂O auf 100ml auffüllen

2.1.5 Konstrukte

WNK 1	(freundlicherweise von Frau Prof. Melanie Cobb, Universität Texas, zur Verfügung gestellt)
NCCT	(aus Ratten-Nieren cDNA amplifiziert und in POGII zur Oozyten Expression ligiert)
FLAG-NCCT	(FLAG-Epitop durch gerichtete Mutagenese in das genannte Konstrukt eingesetzt)

2.1.6 Antikörper

anti-Flagrabbit M2	(Sigma, www.sigma.com)
anti-Rabbit IgG POD	(Sigma, www.sigma.com)
Cy2-goat-anti-mouse	(Amersham Bioscience, www.amershambioscience.com)

2.1.7 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue MRF (Stratagene, www.stratagene.com)

2.1.8 Versuchstiere

Südafrikanischer Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) aus der Versuchstierhaltung der Philipps-Universität

2.1.9 Reagenzsysteme

Cycle Sequencing Kit “BigDye Terminator v1.1”

(Applied Biosystems, www.appliedbiosystems.com)

ECL plus Western Blotting Detection System

(Amersham Bioscience, www.amershambioscience.com)

QIAprep Spin Miniprep Kit-250

(Qiagen, www.qiagen.com)

QIAGEN Plasmid Midi Kit-25

(Qiagen, www.qiagen.com)

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

(Stratagene, www.stratagene.com)

mRNA Transkriptions-Kit “mMessage mMachine T7”

(Ambion, www.ambion.com)

High Pure PCR Product Purification Kit

(Roche, www.roche-applied-science.com)

2.1.10 Oligonukleotide

Hergestellt von Firma MWG (www.mwg-biotech.com):

hsNCCT_T7: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

hsNCCT_f1: 5'-TTC TGC ATG CGC ACC TTT -3`

hsNCCT_f2 : 5`-GGC GTG ATC CTC TAC CTG-3`

hsNCCT_f3: 5`-ATG GAG TGG GAG TCC AAG-3`

hsNCCT_f4: 5`-GTC CTG AAT GAC ACA GTG A-3`

hsNCCT_f5: 5`-CCC ATC ATT TCC AAC TTC-3`

hsNCCT_f6: 5`-GCC CTG GTG GAC TTT GTG-3`

hsNCCT_f7: 5`-AAC GTG TCC AAG ATG ATG-3`

hsNCCT_f8: 5`-CCA GAT TAA CAG GAT GGA C-3`

hsNCCT_f9: 5'-GCT GCT CTC ATC GTC ATC-3'

NCCT-R83W_f:

5'-GGT GAG CCC CGG AAG GTC TGG CCC ACA CTG GCT GAC C-3'

NCCT-R83W_r:

5'-GGT CAG CCA GTG TGG GCC AGA CCT TCC GGG GCT CAC C-3'

NCCT-R135C_f:

5'-AAC CCC GAG GAG CCA GTG TGC TTC GGC TGG GTC AAG G-3'

NCCT-R135C_r:

5'-CCT TGA CCC AGC CGA AGC ACA CTG GCT CCT CGG GGT T-3'

NCCT-T180R_f:

5'-TCA TCC TGC TGT CGG TCA GGG TGA CCT CCA TCA CAG G-3'

NCCT-T180R_r:

5'-CCT GTG ATG GAG GTC ACC CTG ACC GAC AGC AGG ATG A-3'

NCCT-G264A_f:

5'-ACG ACA TCC GCA TCA TTG CCG TGG TCT CGG TCA CTG T-3'

NCCT-G264A_r:

5'-ACA GTG ACC GAG ACC ACG GCA ATG ATG CGG ATG TCG T-3'

NCCT-D486N_f:

5'-TTC CAG TGC CTT TGC GAG AAC CAG CTG TAC CCA CTG A-3'

NCCT-D486N_r:

5'-TCA GTG GGT ACA GCT GGT TCT CGC AAA GGC ACT GGA A-3'

NCCT-S614P_f:

5'-CCA GAG GTA AAT TGG GGC CCC TCG GTA CAG GCT GGC T-3'

NCCT-S614P_r:

5'-AGC CAG CCT GTA CCG AGG GGC CCC AAT TTA CCT CTG G-3'

NCCT-G731R_f:

5'-ATG CAG GCC GCA GGT CTC AGG AGA ATG AAA CCC AAC A-3'

NCCT-G731R_r:

5'-TGT TGG GTT TCA TTC TCC TGA GAC CTG CGG CCT GCA T-3'

NCCT-R887Q_f:

5'-CTC TGC TGA GCA AGT TCC AAC TGG GAT TCC ATG AAG T-3'

NCCT-R887Q_r:

5'-ACT TCA TGG AAT CCC AGT TGG AAC TTG CTC AGC AGA G-3'

NCCT-R904Q_f:

5'-ACA TCA ACC AGA ACC CTC AGG CTG AGC ACA CCA AGA G-3'

NCCT-R904Q_r:

5'-CTC TTG GTG TGC TCA GCC TGA GGG TTC TGG TTG ATG T-3'

NCCT-R919C_f:

5'-GAC ATG ATT GCA CCC TTC TGT CTG AAT GAT GGC TTC A-3'

NCCT-R919C_r:

5'-TGA AGC CAT CAT TCA GAC AGA AGG GTG CAA TCA TGT C-3'

NCCT-V1015M_f:

5'-CGA GGA AAC CAG GAA AAC ATG CTC ACC TTT TAC TGCC-3'

NCCT-V1015M_r:

5'-GGC AGT AAA AGG TGA GCA TGT TTT CCT GGT TTC CTC G-3'

2.1.11 Software

Lasergene Sequenzanalyse (DNASTAR Inc., www.dnastar.com)

KaleidaGraph Statistik-Software (Synergy Software, www.synergy.com)

2.2 Methoden

2.2.1 Sequenzieren des Flag NCCT x pT7Ts

Um die Basenabfolge des FlagNCCT vollständig überprüfen zu können, wurde die Sequenzierung eingesetzt. Es wurden Oligonukleotide (siehe oben: hsNCCT_T7 - hsNCCT_f9) als Primer benutzt, die so konzipiert waren, dass die DNA lückenlos analysiert werden konnte.

Für die Sequenzierung ist das Cycle Sequencing System von Applied Biosystem (ABI) verwendet worden.

Es wurde jeweils folgender Ansatz hergestellt:

1,0µg Plasmid-DNA

ad 12,5µl H₂O

1,5µl Big Dye Terminator Mix

1,0µl Oligoprimer

Die Reaktion vollzog sich in 25 Zyklen mit dem Temperaturprofil:

10s 94°C - 5s 50°C - 4 min. 60°C, mit folgender Abkühlung auf 4°C.

Anschließend wurden die Proben in 1,5ml Mikrozentrifugencups gefällt. Zur Fällung wurden dem Ansatz 80µl H₂O, 10µl 3M NaAc (pH 4,6) und 250µl 100% EtOH hinzugefügt und gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 20min. mit 13000 rpm bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 80% EtOH gewaschen und ein weiteres Mal für eine Dauer von 15min. unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach vollständigem Verwerfen des Überstands, wurde das Pellet im Heizblock bei 37°C für 10min. getrocknet, damit das Ethanol vollständig verdampfen konnte. Nachdem die Pellets in 20µl Template-Suppression-Reagent durch mehrfaches auf- und abpipettieren gelöst waren, wurden die Proben in ein Sequenzieretube (luftblasenfrei) überführt und das Septum aufgesetzt. Anschließend wurden die Proben

3min. bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Bis zur Sequenzierung lagerten die Proben im Kühlschrank bei 4°C. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte am Institut für Physiologie der Universität Marburg (ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Pro Sequenzierprobe wurden ca. 350 Basenpaare dargestellt, die mit Hilfe der Lasergene Sequenzanalyse-Software von DNASTAR ausgewertet wurden.

2.2.2 DNA Synthese

2.2.2.1 Mutagenese

Mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis System von Stratagene können gezielte Sequenzen in doppelsträngigen Plasmiden mutiert werden.

Für die Reaktion benötigt man einen zirkulär geschlossenen Doppelstrang-DNA-Vektor und zwei Oligonukleotid-Primer (siehe Abbildung 2-1: Step 1 und Step 2). Die aus circa 36 Basen bestehenden Oligonukleotid-Primer enthalten genau in der Mitte die gewünschte Mutation und sind ansonsten zu der Sequenz auf den jeweils entgegengesetzten Strängen des Vektors und darüber hinaus zueinander komplett komplementär. Die nicht bindenden mutierten Sequenzen, mismatch-Sequenzen, müssen sowohl in einem geeigneten Verhältnis zur Gesamtlänge des Primers stehen, als auch in der Mitte des Primers liegen, so dass die Polymerisation durch die ungepaarten Nukleotide nicht behindert wird. Somit wurde die Mutation von jeweils ca. 15 Basen eingerahmt.

Bei der Konstruktion der die Mutation enthaltenen Primer wurde darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur ausreichend hoch lag. Der Schmelzpunkt wurde nach folgender Formel berechnet: $T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - 675 / N - \% \text{ mismatch}$ (N entspricht der Primerlänge in bp).

Es wurden folgende Oligonukleotide als Primer konzipiert (siehe oben: NCCT-R83W_f - NCCT-V1015M_r).

In einem Ansatz für die Amplifikationsreaktion befanden sich:

5,0 µl Pfu-10xPuffer
2,0 µl dsDNA-template
1,5 µl Vorwärtsprimer (f) (10µM)
1,5µl Rückwärtsprimer (r) (10µM)
1,0 µl dNTP-Mischung (10mM)
1,0 µl Pfu-Turbo-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
2,5 µl DMSO
H₂O ad 50,0 µl (= 35,5 µl)

Während der PCR verlängert die Pfu-Turbo-DNA-Polymerase die Primer und generiert durch die Inkorporation der Mutation zwei mutierte lineare Stränge mit überhängenden Enden, die zueinander komplementär sind (siehe Abbildung 2-1: Step 2). Das Plasmid kann sich wieder kreisförmig aneinanderlagern. Die Pfu-Polymerase stammt aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furoisus* und besitzt nicht nur die 5'→3' Aktivität, sondern auch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität, durch die sie falsch eingebaute Nukleotide korrigieren und somit mit sehr hoher Präzision arbeiten kann. Nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 30 Sekunden, folgten 18 Zyklen mit folgendem Temperaturprofil: 30s 95°C – 1min 55°C – 12min 30s 68°C. Anschließend wurde einer Dauerkühlung bei 4°C durchgeführt.

Im Anschluss folgte der Dpn-Verdau. Jedem Amplifikat wurde 2,0 µl DpnI hinzugefügt, gemischt und bei 37°C für 2 Std. inkubiert.

Die nicht mutierte ursprüngliche DNA wurde somit gezielt abgebaut, da die Dpn-Endonuklease die methylierte und halbmethylierte DNA spezifisch schneidet (siehe Abbildung 2-1: Step 3).

Um die DNA zu reinigen und zu konzentrieren, war es notwendig, die DNA zu fällen. Der Nukleinsäure wurde durch Zugabe von Salz und Alkohol Wasser entzogen, damit sie denaturiert. Es bildete sich ein Präzipitat aus, das abzentrifugiert und im gewünschten Volumen wieder gelöst wurde.

Folgender Ansatz wurde in 1,5 ml Mikrozentrifugen-Tubes hergestellt:

Der Mutagenese-Ansatz wurde mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt

10 µl Natriumacetat (3M) pH 5,0

250 µl 100% Ethanol bei -20°C gekühlt

Der Ansatz wurde gemischt und bei -20°C für mindestens 30min gefällt. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt (13000rpm, bei 4°C, 15min.) wurde der salzige Überstand abgenommen, zum Waschen jedem Pellet 400µl 70% Ethanol (-20°C) hinzugefügt und nochmals für 15min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Pellets nach zehnminütigem Trocknen im Heizblock bei 37°C zum Verdampfen des restlichen Ethanols in 10µl H₂O resuspendiert. Bis zur Transformation wurde die DNA gekühlt auf Eis gelagert.

Für die Transformation wurden E.coli Bakterien des Stammes XL1-Blue verwendet.

Beim Auftauen der elektrokompetenten Bakterien wurde darauf geachtet, dass sie ständig auf Eis gehalten wurden, um ein Platzen der Bakterien bei Raumtemperatur zu vermeiden. Die DNA-Proben und die Küvette wurden ebenso auf Eis vorgekühlt. Zu jeweils 50µl XL-1-Blue Bakterien wurden je 2µl des Ligationsansatzes hinzugefügt, gemischt und in die vorgekühlte Küvette transferiert.

Am Elektroporator wurden folgende Einstellungen gewählt:

Pulse-Control & Power-Supply: Capacitance: 330µF, Low Omega,

Charge Rate: Fast, Voltage-Booster: 4 kOmega

Die Küvette wurde abgetrocknet und in den Elektroporator gestellt. Dann wurde ein kurzer Spannungsimpuls von 400V verabreicht. Bei korrektem Stromfluss sollte ein Wert von 2,4kV am Voltage Booster abzulesen sein. Nach der Transfektion in superkompetente Bakterien wurden die Einzelstränge in dem mutierten Plasmid repariert (siehe Abbildung 2-1: Step 4).

Unmittelbar danach wurde auf die Bakterien 200µl vorgewärmtes SOC-Medium gegeben. Das Gemisch wurde mit einer sterilen Pipette in ein Mikrozentrifugen-Tube überführt und zur Erholung eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert.

Nach der Erholungsphase wurden je 3µl, 30µl, 200µl der Bakterien auf mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatten ausgestrichen, die dann über Nacht bei 37°C bebrütet wurden, um einzelne Kolonien der transformierten Bakterien zu erhalten.

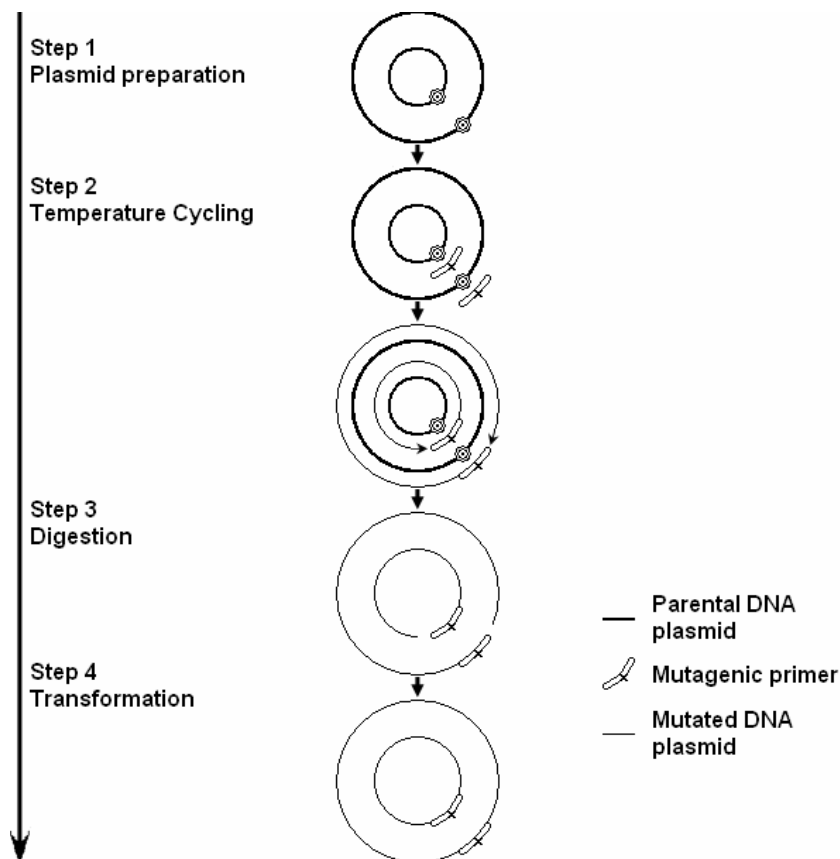


Abbildung 2-1: Überblick über die QuikChange site-directed Mutagenesis Methode.

In mehreren Schritten wird in das ursprüngliche Plasmid eine Mutation eingefügt, indem zunächst ausgehend von die Mutation enthaltenden Primern jeweils der Komplementärstrang synthetisiert wird und anschließend der ursprüngliche Strang durch Verdau selektiv entfernt wird. Durch ihre Komplementarität bilden die beiden neu synthetisierten Stränge trotz Einzelstrangbruch ein zirkuläres Molekül, welches in Bakterien transformiert werden kann.

2.2.2.2 Mini-Präparation

Einzelne Klone wurden von entsprechenden Agarplatten isoliert und in 6ml LB-Medium mit geeigneter Antibiotikakonzentration (100µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 300rpm inkubiert. Die eigentliche Minipräparation wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit durchgeführt. Es wurden je 5ml der LB-Medium overnight-Kultur in 50ml-Falcon-Tubes bei 4000rpm in einer Universalzentrifuge

10min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Bakterien-Pellet in 250µl P1 Buffer sorgfältig resuspendiert und in ein 1,5ml-Mikrozentrifugentube transferiert. Dann wurden 250µl P2 Buffer zugegeben, gut durchmischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Alkalisierung wird die lineare chromosomale Bakterien-DNA irreversibel denaturiert. Die Neutralisation erfolgte durch Zugabe von 350µl N3 Buffer und vorsichtiges Mischen. Der nächste Schritt war eine Zentrifugation für 10min bei 13000rpm, um den Zelldebris aus der Lösung zu entfernen. Ausgefallene Proteine, genomische DNA und Membrankomplexe bildeten das weiße Pellet.

Der DNA-enhaltende Überstand wurde in die QIAprep Spin Column überführt, dieses dann eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Durch Waschen mit 500µl PB Buffer wurden weitere Endonukleasen entfernt. Nach dem anschließenden einminütigem Zentrifugationsschritt bei 13000rpm wurde das Zentrifugat wiederum verworfen. Um die Salze zu entfernen, folgte der nächste Waschschrift mit 750µl PE Buffer und eine weitere Zentrifugation (1min, 13000 rpm). Zum Abschluss wurde noch ein letztes Mal eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert, um im Anschluss die Spin Column auf ein neues Mikrozentrifugen-Tube umzusetzen. Zur Elution wurden 50µl H₂O auf die Säulen pipettiert, 1min. stehen gelassen und für 1min bei 13000rpm zentrifugiert.

Um die Nukleinsäuren zu quantifizieren, war die photometrische Bestimmung bei 260 nm die einfachste Methode. Zur Kontrolle der Reinheit wurde der Quotient aus OD 260 und OD 280 bestimmt, der oberhalb 1,5 liegen sollte.

Für die Extinktion wurde die gewonnene DNA auf 1:50 verdünnt.

Anschließend wurde die klonierte cDNA mittels der oben genannten Primern sequenziert, um den Erfolg der Mini-Präparation im Hinblick auf die Mutationen zu überprüfen. Die ermittelten Sequenzen wurden mit der Sequenz des Wildtyps (Simon) verglichen.

2.2.2.3 Midi-Präparation

Klone mit dem gewünschten mutierten Plasmid sollten nun amplifiziert werden, um größere Mengen des gewünschten Konstrukts zu erhalten. Dazu wurden 100 ml LB-Medium (+ Ampicillin 100 ng/ml) mit einigen μ l Mini-Kultur beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension, deren Dichte optimalerweise eine Milliarde pro ml aufwies, von jeweiligem Klon auf je 2 mal 50ml Falcon-Tubes verteilt. Durch Zentrifugation für 10min. bei Raumtemperatur und 4000rpm wurden die Bakterien am Boden des Falcontubes gesammelt und der Überstand abgekippt.

Die Isolierung und Aufreinigung der DNA erfolgte mittels QIAGEN Plasmid Midi System. Dieses Prinzip beruht wie auch die Mini-Präparation auf alkalischer Lyse. Mittels spezieller Filter werden Salze, Proteine und Detergenzien abgetrennt. Die endgültige Aufreinigung erfolgt durch eine Anionenaustauschersäule, deren positive Gruppen durch Diethylaminethanol gebildet werden. Somit können RNA, Proteine und kleine Metabolite entfernt werden, wodurch eine hohe Reinheit entsteht.

Das Pellet wurde in 4ml Buffer P1 im ersten Falcontube und nach Überführen der Suspension auch im zweiten Falcontube resuspendiert. Daraufhin wurde dem Pellet 4ml des SDS enthaltenen Buffers P2 hinzugefügt, vorsichtig gemischt, was zur Zelllyse und Denaturierung der DNA und der Proteine führt. Nach 5min wurde mit 4ml gekühltem Buffer P3 neutralisiert, gemischt und sofort mittels 10ml Pippette in ein Zentrifugenröhrchen transferiert. Durch die hohe Salzkonzentration fällt das SDS aus und der Zellschrott wird in Salz-Detergenz-Komplexen gebunden. Nach einer Inkubationszeit von 15min auf Eis und einem Zentrifugationsschritt für 30min bei 4°C und 13000rpm wurde der DNA enthaltene Überstand der Probe, nachdem die QIAGEN-tip-Säule mit 4ml Buffer QBT (Äquilibrationspuffer) äquilibriert wurde, auf die Säule gegeben. Beim Durchsickern des Lysats bindet das Plasmid an die Säule. Die an die Säule gebundene DNA wurde anschließend zweimal mit 10ml Buffer QC gewaschen. Bevor die Elution der DNA mit 5ml stark salzhaltigem Buffer QF erfolgte, wurde das

Tip auf ein neues 50ml Falcontube transferiert, in dem das plasmidenthaltene Eluat aufgefangen wurde. Durch Hinzufügen von 3,5ml Isopropanol zum Eluat wurde die DNA präzipitiert. Das Eluat wurde dann auf 1,5ml-Cups verteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 30min bei 4°C und 30000rpm, anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgekippt. Das DNA-Pellet wurde mit jeweils 350µl 70% EtOH (-20°C) gewaschen, 10min bei 4°C und 1300rpm zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgekippt. Nachdem das Pellet in der Speed Vac für 5min bei 50°C und 1800rpm getrocknet wurde, wurde es in 10µl H₂O wieder gelöst. Die Proben wurden pro DNA in einem 1,5ml Cup gesammelt. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen DNA in einer Verdünnung von 1:100 auf 100µl photometrisch bei 260nm bestimmt. Die Proben wurden auf eine Konzentration von 1µg/µl verdünnt und bei -20°C eingefroren.

2.2.2.4 Glycerolstocks

Um zur Plasmidsynthese jederzeit wieder auf den erfolgreich transformierten Bakterienklon zurückgreifen zu können, wurden Glycerolstocks angelegt. Dafür wurden aus der über Nacht in 100 ml LB-Medium gewachsenen Bakterien Suspension, die für die Midi-Präp angelegt worden waren, 850µl mit 160µl Glycerol vermischt und bei -80°C tiefgefroren.

2.2.3 RNA Synthese

2.2.3.1 Linearisierung der DNA

Bevor die cRNA-Synthese stattfinden konnte, musste die DNA 3' des vom Vektor kodierten poly-A-Schwanzes linearisiert werden. Der Linearisierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 7µl H₂O, 1µl cDNA (entsprechend 1 µg), 2µl 10xPuffer4 und 1,5µl EcoR1 (10U/µl) und 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der

Linearisierung wurde durch Elektrophorese mit einem 0,8%igem Agarose-Gel überprüft. Die Aufreinigung der linearisierten DNA erfolgte anschließend jeweils mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ von Roche.

Zur Probe wurden 500µl Binding Buffer gegeben und gemixt. Darauf wurde der Mix auf den High Pure Filter gegeben und 60s bei „maximal speed“ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nach dem ersten Waschgang mit 500µl Wash Buffer wurde die Probe wieder 1min bei 13000rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde wieder verworfen. Es folgte ein weiterer Waschgang mit 200µl Buffer und eine weitere Zentrifugation für 1min bei 13000rpm mit anschließendem Verwerfen des Durchflusses. Die Probe wurde mit 50µl H₂O aufgefüllt und bei 13000rpm 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion der linearisierten DNA mit der Verdünnung 98µl H₂O + 2µl Probe gemessen.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Um die Reinheit der linearisierten DNA zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gel-Elektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifikation und/oder Reinigung von DNA-Fragmenten. Die Lage der DNA im Gel kann direkt durch das Anfärben von Ethidiumbromid im UV-Licht bestimmt werden.

Für das Gel benutzt man Agarose. Bei Agarose handelt es sich um ein lineares Polysaccharid, das aus Rotalgen gewonnen wird. Es wurde in Gegenwart des gewünschten Puffers geschmolzen bis eine klare Lösung entstand, die dann mit einem Plastikschieffchen für die Gelkammern in Form gegossen wurde. Beim Erkalten erstarrt es zu einer Matrix, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration bestimmt wird.

Die Auftrennung erfolgte horizontal in einem elektrischen Feld konstanter Stärke und Richtung. Da die DNA bei neutralem pH negativ geladen ist, wandert sie zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zu ihrer Länge.

Die Ionen des Laufpuffers ermöglichen den Stromfluss. Das Gel wird vom Puffer knapp bedeckt. Da beides einen ähnlichen elektrischen Widerstand aufweist, fließt ein großer Teil des Stroms durch das Gel.

Der 6x Ladepuffer enthält 30% Glycerol, so dass die Proben in den Geltaschen absinken sowie blaue Farbstoffe, die die Wanderung im Gel visualisieren.

Ethidiumbromid ist ein krebserregender Stoff, der UV-Licht absorbiert und die Energie als oranges Licht von 550nm wieder abstrahlt. Jeder Probe wurden 2µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die DNA-gebundenen Farbstoffe fluoreszieren stärker als die im Gel befindlichen, womit sich die DNA-Banden deutlich abheben. Mit Polaroidfilmen wurde das Bild der Nukleinsäuren im Gel festgehalten.

2.2.3.3 c-RNA-Synthese

Die cRNA-Synthese wurde mit Hilfe der mMessage mMachine High Yield Capped RNA Transcription Kit durchgeführt. Bei dem Umgang mit RNA ist darauf zu achten immer besonders sauber zu arbeiten, da ein Kontakt mit RNAsen unbedingt vermieden werden muss. Es wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt:

5 µl 2xNTP/cap

3 µl cDNA

1 µl 10xT7 Reaktionspuffer

1 µl T7 Enzym-Mix

Dieser Ansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Präzipitation der RNA wurde durch Hinzufügen von 15µl H₂O (Nuklease frei) und 12,5µl Lithiumchlorid-Präzipitationslösung durchgeführt. Anschließend wurde zur Fällung der RNA das Gemisch für mindestens 30 min bei -20°C stehen gelassen, um es danach für 15min bei 4°C und 13000rpm zu zentrifugieren. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 500µl 70%EtOH (-20°C) gewaschen und nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde die Probe zum Trocknen des Pellets in die Speed Vac. für circa 4-5min bei Raumtemperatur und 1800rpm gestellt. Abschließend wurde das Pellet in 15µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung der Konzentration der gewonnenen RNA wurde die Probe auf 1:100 verdünnt und photometrisch bei 260 nm gemessen.

Die Reinheit der RNA wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese (siehe oben) ermittelt. Hierfür wurde ein 0,8% Agarosegel hergestellt, was mit 200ng cRNA in 2µl H₂O und 2µl 2xRNA-Loading-Buffer, plus zusätzlich 4µl der DNA-Ladder zur Markierung, beladen wurde. Die Elektrophorese wurde bei 100V für 20 min durchgeführt.

Anschließend wurden die reinen Proben in 3µl Portionen mit einer Konzentration von 200ng aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Oozytenpräparation

Für die Oozytenpräparation wurden die Oozyten des Frosches *Xenopus laevis* (südafrikanischer Krallenfrosch) benutzt. Zu Beginn wurde das Froschweibchen mit einer 0,1%-igen Aminobenzoesäureethylestermethansulfanatlösung für 30min narkotisiert. Danach wurde der Frosch auf Eis gelegt und das Abdomen mit Äthanol desinfiziert, um sterile Bedingungen zu schaffen. Bei der Operation wurde die Haut oberhalb der Inguinalfalte gegriffen, um eine 5-8mm dicke Inzision zu setzen (siehe Abbildung 2-2). Das darunter liegende Peritoneum wurde auch gegriffen und aufgeschnitten. Die Oozyten wurden in ihren bindegewebigen Ovarialsäckchen entnommen und sofort in eine mit ND96 beinhaltende Petrischale überführt (siehe Abbildung 2-3). Die Wunde wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial wieder verschlossen, wobei Peritoneum und Hautschicht getrennt zugenäht wurden. Anschließend wurden die Oozyten vorsichtig mechanisch durch zwei Pinzetten unter dem Mikroskop voneinander gelöst. Es folgten mehrere Waschgänge mit OR2, bis der Überstand klar war, dann wurden die Oozyten in ein Wägeschälchen überführt. Nachdem 10ml Kollagenaselösung hinzugefügt wurden, um die Bindegewebsschicht von den Eiern zu lösen, wurden die Oozyten für eine Stunde unter Schütteln bei 16°C und 80rpm inkubiert. Der anschließende Waschschrift, um den Kollagenaseverdau zu stoppen und zweite Inkubationsschritt mit der Kollagenase folgten unter gleichen Bedingungen. Bis der Überstand klar war, wurde ein letztes Mal mit OR2 und ND96 gewaschen, bevor die Oozyten dann in mit ND96-Aufbewahrungslösung aufgefüllten 6-well-plates sortiert wurden. Die aussortierten Oozyten wurden bis zur Injektion unter Schütteln bei 16°C inkubiert.

**Abbildung 2-2: IZision der Bauchdecke****Abbildung 2-3: Entnahme der Oozyten**

2.2.5 Oozyteninjektion

Sämtliche Vorgänge der cRNA-Injektion mussten steril erfolgen, um eine Kontamination mit RNAsen zu vermeiden. Vor der eigentlichen Injektion mussten die Glaskapillaren mit Hilfe des PUL1-Gerätes (Delay 4, Heat 9, Tension Adjust Low) hergestellt werden und die defollikulierten Oozyten ein letztes Mal sortiert werden. Die RNA enthaltenen Aliquots wurden auf Eis aufgetaut. Bei Koexpressionen wurden die entsprechenden Mischungen hergestellt. Hierfür wurde die RNA der WNK1 in der Speed Vac für 5 min eingetrocknet, anschließend in der jeweiligen RNA des NCCTs Wildtyp oder Mutation gelöst und wieder auf Eis gehalten. Die Spitze der Glaskapillare wurde unter dem Mikroskop abgebrochen und mit Mineralöl befüllt. Mit Hilfe des Mikroinjektors wurde die RNA (Aliquot mit $c=200\text{ng}/\mu\text{l}$ in $3\mu\text{l}$ Portionen) in die Glaskapillare aufgezogen und pro Oocyte in 10ng (bzw. 20ng) Portionen injiziert. Pro Konstrukt wurden jeweils 40 Oozyten injiziert. Nach Beendigung der Injektion wurden die Oozyten in die mit ND96-Aufbewahrungslösung 24-well-plates überführt.

Nach vier Tagen Expressionszeit unter Schütteln (80rpm) bei 16°C , in der das Medium alle zwei Tage gewechselt wurde, konnten die Oozyten für weitere Versuche verwendet werden.

2.2.6 Funktionelle Chlorid-Isotop (^{36}Cl) Uptake-Messungen

Um die Funktion des Natrium-Chlorid-Transporters und der Mutationen *in vitro* messen und vergleichen zu können, wurde die Methode der Chlorid-Up-Take-Messungen angewandt. So konnte gemessen werden, wie viele Chloridionen die einzelnen Oozyten innerhalb des bestimmten Zeitraumes aufgenommen haben. Hierfür benutzte man radioaktives Chlorid, so dass man anschließend von der Radioaktivität der Oozyten auf das aufgenommene Chlorid indirekt schließen konnte.

Damit man eine statistisch gültige Aussage machen konnte, wurden je Konstrukt immer 15 Oozyten ausgewählt.

Nach Auswahl von jeweils 15 Oozyten pro Konstrukt wurden diese in ein Röhrchen-Tube transferiert und sofort zweimal hintereinander mit chloridfreier ND96 (ca. 5ml) bei Raumtemperatur gewaschen und sorgfältig abgesaugt, um das gesamte Chlorid aus dem umliegenden Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Eier in dieser Lösung für 15min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die Lösung wurde vollständig und vorsichtig abgesaugt. Sofort wurden jeweils 109µl Uptake-Lösung pro Konstrukt auf die Oozyten pipettiert und für eine Stunde inkubiert.

Zur Herstellung der Uptake-Lösung (^{36}Cl -Endkonzentration 5 mM) im Isotopenlabor, wurde der Originalstock (7,49 mg/ml (208 mM)) im Verhältnis 1:40,6 mit chloridfreier 1x ND96 verdünnt.

Nach der Inkubation wurde die Uptake-Lösung komplett und vorsichtig abgesaugt. Unmittelbar danach folgten fünf Waschgänge mit eisgekühlter 1xND96 (5ml pro Waschgang), um den Stoffwechsel der Eier herunterzuregulieren und damit eine weitere Aktivität des Transporters einzustellen. Darauf wurden die Oozyten mittels einer Glaspipette einzeln in die Szintillationsröhrchen überführt. Um die Oozyten zu lysieren, wurden sie mit je 100µl 1M NaOH über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde mit je 100µl 1M HCl neutralisiert und jede Probe gevortext, so dass die Oozyten vollständig homogenisiert vorlagen. Auf die Proben wurden jeweils 2ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Abschließend wurde die Chloridaufnahme am beta-Szintillationszähler des Institutes für Molekularbiologie und Tumorforschung der Universität Marburg gemessen.

2.2.7 Western Blot

Mit der Westernblot-Methode können Proteine nach Auftrennung mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden und mit spezifischen Antikörpern detektiert werden.

Western Blot Lysate

Die Lysate wurden aus den fertigen FlagNCCT-Konstrukten angefertigt. 250µl Lysispuffer und Complete (Proteaseinhibitor) (im Verhältnis 24:1) wurden auf je zehn Oozyten eines Konstruktes gegeben, das Gemisch wurde homogenisiert, 15min. auf Eis inkubiert und 25min. bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Darauf wurden 40µl des Zelllysates mit 5µl 10x SDS-Sample-Puffer und 2µl beta-Mecaptoethanol (BME) gemischt und bei -20°C gefroren.

SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Polyacrylamid-Gelen können kleinere Poren als mit Agarosegelen hergestellt werden. Die gewünschte Porengröße wird durch den prozentualen Anteil des Monomeres Acrylamid bestimmt. Gestartet wird die Polymeration durch 10% Ammoniumpersulfat und N, N, N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED). Gebunden an Natrium-Dodecyl-sulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und negativ geladen. Somit erfolgt die Auftrennung nur durch das Molekulargewicht und wird nicht durch die Tertiärstruktur oder die Ladung beeinflusst.

Dem Trenngel ist ein weitporiges Sammelgel vorgeschaltet. Hier werden die Proteine bei niedrigem pH konzentriert, wodurch eine bessere Auflösung erzielt werden kann.

Vor dem Gießen der Gele mussten die Glasplatten, der Spacer und der Kamm gut mit 100% Ethanol gereinigt werden. Bei dem Mischen des Trenngels musste darauf geachtet werden, dass das APS als letztes hinzu gegeben wurde. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe einer Spritze vorsichtig zwischen die Glasplatten gefüllt.

Nach Gießen und Trocknen des Trenngels wurde in das obere Drittel der Gelkammer über das Trenngel das Sammelgel in gleicher Weise gegossen. Dann wurde der Kamm in das Sammelgel gesteckt und 30min gewartet. Das Gel wurde aus der Apparatur

entfernt und in die Running Apparatur eingesetzt. Die ganze Apparatur wurde mit 1x Laufpuffer befüllt bis das komplette Gel bedeckt war. Nach dem Entfernen des Kamms konnten die Taschen durch die Mikrospritze beladen werden. Dafür wurden vorher die Proben und der Rainbow Marker auf Eis aufgetaut. Die vertikale Elektrophorese konnte gestartet werden. Die Spannung betrug 100 V bei einer Stromstärke von 24 mA für 1,5 Stunden.

Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine PVDF/Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Nitrocellulosemembran gebunden. Dazu wurde das Gel auf die Membran gegeben, die beidseits je von einem Filter und einem Schwamm umgeben war. Die Membran, die Filter und die Schwämme mussten vorher gut in 1x Transferpuffer gebadet werden. Mit Hilfe der Vorrichtung wurde die Membran zwischen Anodenplatte und Kathodenplatte unter Druck zusammengeschraubt. Vor dem Beginn des Blottens musste der Kühlakku und ein Rührfisch eingelegt werden und die Kammer mit 1 x Transferpuffer befüllt werden. Der Transfer geschah innerhalb 1,5 Stunden bei 100 Volt.

Im Anschluss wurde die Membran über Nacht in Stopplösung bei 4°C inkubiert, wodurch unspezifische Bindungen blockiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Membran mit dem ersten Antikörper, alpha Flagrabbit M2, in entsprechender Verdünnung für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Es folgte eine zweite Inkubation mit dem gleichen Antikörper unter gleichen Bedingungen.

Die Antikörperlösung wurde wie folgt hergestellt:

50ml TTBS

2,5g Magermilchpulver

10µl Rabbit anti Flag

Die Antikörperlösung wurde auf zwei Membranen für zwei Inkubationsschritte aufgeteilt, so dass pro Inkubationsschritt und Membran 10ml der Lösung zum Einsatz kamen. Um die spezifische Bindung des Antikörpers an dem Epitop des Antigens nachzuweisen, wurde ein sekundärer spezies-spezifischer Antikörper angewendet. Nach drei Waschgängen mit TTBS mit dem Schema 15min., 10min., 10min. wurde die

Membran mit dem zweiten Antikörper, POD-anti rabbit-IgG, für zweimal eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Hierfür wurde dieselbe Antikörperlösung produziert wie die erste, nur mit POD-anti rabbit anstelle von anti-Flag. Erneut wurde wie oben gewaschen.

Für die Filmentwicklung wurde das Gemisch von 975µl der Lösung A und 25µl der Lösung B des ECL Plus auf die Membran gegeben und für 2min einwirken gelassen. Anschließend wurde die Lösung mit einem Zellulosetuch abgesaugt, mit Folie bedeckt und mit dem Hyperfilm ECL belichtet. In der Röntgenabteilung der Kinderklinik Marburg wurden die Filme entwickelt.

2.2.8 Immunfluoreszenz an Oozytenschnitten

Die Immunfluoreszenz an Oozytenschnitten ist eine Methode, um den exprimierten Transporter auf der Membran der Oozyte mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen.

Oozytenschnitte:

Nach den 4 Tagen Expressionszeit wurden jeweils fünf Oozyten zusammen in einem Block TissueTek bei - 4°C tiefgefroren. Mit Hilfe des Kryotoms wurden die in Blöcken fixierten Oozyten in Scheiben geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

Immunfluoreszenz:

Die Oozytenschnitte wurde zu Beginn in 4% Paraformaldehyd in PBS für 5min. fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte mit PBS 3x gewaschen und dann mit Blockierungslösung für 30min bei Raumtemperatur inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blockieren und die Oozytenmembran zu permeabilisieren. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit dem ersten Antikörper, M2Flag, in der Verdünnung 1:1000 in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Schnitte wurden fünfmal mit PBS gewaschen, um dann mit dem zweiten Antikörper, Cy2-goat-anti-mouse, ebenfalls in der Verdünnung 1:1000 in PBS für zwei Stunden bei Raumtemperatur ohne Lichtexposition inkubiert zu werden. Die Schnitte wurden nach

fünf Waschgängen mit PBS mit Glycerolgelatine bei 50°C auf der Wärmeplatte eingedeckelt.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte unter dem Immunfluoreszenzmikroskop mit blauem Licht angeregt, so dass der zweite Antikörper in der Oozytenmembran durch grünes Licht sichtbar wurde bzw. nicht sichtbar wurde. Die Immunfluoreszenzanfärbung wurde anhand einer Immunfluoreszenzkamera festgehalten.

2.2.9 Auswertung und Statistik

Für die Auswertung der Chlorid-Up-Take-Messungen wurden Mean und standard error of the mean (SEM) pro Konstrukt für jeweils 15 Oozyten der gleichen Präparation gezeigt. Die Experimente wurden fünfmal wiederholt an verschiedenen Oozyten von verschiedenen Fröschen. Die Fehlerbalken wurden aus dem Standard Error of the Mean (SEM) kalkuliert. Statistische Signifikanzen wurden durch den Student T-test (unpaired test with unequal variance) analysiert und bei $p < 0.05$ festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung der Mutationen und Patientendaten

Die neuen Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) wurden alle im Zusammenhang mit dem Gitelman Syndrom entdeckt (siehe Tabelle 3-1). Das Blut der Patienten mit Verdacht auf eine renale Salzverlusterkrankung wurde zur molekulargenetischen Analyse in das Labor der Kinderklinik Marburg geschickt. Dr. Jeck identifizierte die Mutationen im SLC12A3 Gen und stellte sie freundlicherweise dieser Arbeit für die funktionelle Untersuchung zur Verfügung. Die Mutationen verteilten sich über die Länge des gesamten Proteins ohne Häufung in bestimmten Proteindomänen (siehe Abbildung 1-7).

Zusätzlich untersuchte ich noch drei Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C; siehe Tabelle 3-2).

Tabelle 3-1: Identifizierte Mutationen im SLC12A3 Gen

Mutation	Aminosäurenaustausch	
R83W	Arginin → Tryptophan	homozygot
R135C	Arginin → Cystein	homozygot
T180R	Threonin → Arginin	homozygot
D486N	Asparaginsäure → Asparagin	homozygot
S614P	Serin → Prolin	homozygot
G731R	Glycin → Arginin	heterozygot
R887Q	Arginin → Glutamin	heterozygot
V1015M	Valin → Methionin	heterozygot

Tabelle 3-2: Identifizierte Polymorphismen im SLC12A3 Gen

Polymorphismus	Aminosäurenaustausch
G264A	Glycin → Alanin
R904Q	Arginin → Glutamin
R919C	Arginin → Cystein

Nicht bei jeder identifizierten Mutation standen ausreichend klinische Daten der betroffenen Patienten zur Verfügung. Vier Patienten jedoch werden im Folgenden vorgestellt, um die klinische Variabilität des Gitelman Syndroms darzustellen.

3.1.1 Fallbeispiele

3.1.1.1 1. Fallbeispiel: Patient mit Mutation R135C

Die Erstdiagnose bei dem Patienten mit der Mutation R135C wurde im Alter von vier Jahren und einem Monat gestellt. Der Patient wurde durch eine Obstipation und schlechten Appetit auffällig. Er zeigte weder Wachstumsauffälligkeiten, noch muskuläre Probleme oder andere Symptome. Eine Routinelaboruntersuchung zeigte eine Hyokaliämie von 2,4 mmol/l. Andere Elektrolyte wie Natrium, Chlorid, Calcium und Magnesium waren im Normbereich. Außerdem zeigte die pH Untersuchung eine leichte metabolische Alkalose von 7,44. Ebenfalls erhöht waren die Werte für Aldosteron und Renin. Es wurde eine orale Therapie mit Kalium und Magnesium begonnen.

3.1.1.2 2. Fallbeispiel: Patient mit Mutation T180R

Bei diesem Patienten wurde die Erstdiagnose erst im Alter von 25 Jahren gestellt. Er beklagte pektanginöse Beschwerden und eine Sinustachykardie bei eingeschränkter Belastbarkeit. In der Laboruntersuchung sah man eine Hypokaliämie (2,3mmol/l) und eine Hypomagnesiämie (0,52mmol/l). Der Säure-Basen-Status zeigte eine kompensierte metabolische Alkalose mit einem pH von 7,38, einem Baseexcess von 10 mmol/l und einem CO₂-Partialdruck von 65 mmHg. Während der Aldosteronwert im Normbereich lag, wurde eine erhöhte Plasminogenaktivität gemessen. Eine Nierensonographie zeigte keine Auffälligkeiten. Auch dieser Patient bekam eine orale Medikation mit Kalium und Magnesium.

3.1.1.3 3. Fallbeispiel: Patient mit Mutation S614P

Der Patient kam im Alter von sieben Jahren und sieben Monaten aufgrund einer Salmonellen-Gastroenteritis zur stationären Aufnahme. Der Junge hatte einen deutlichen Wachstumsrückstand (Gewicht: 15,2kg (< 3.Perzentile); Länge: 108,8cm (<3.Perzentile)). In der Schwangerschaftsanamnese zeigte sich eine Frühgeburt der 34. SSW nach einer unkomplizierten Schwangerschaft. Es wurde eine uterine Infektion vermutet. In der weiteren Anamnese war außerdem eine Enuresis nocturna auffällig. Neben einer Hypokaliämie (1,8mmol/l) und einer Hypochlorämie (83mmol/l) wurden niedrige Werte für Magnesium (kein Wert angegeben) festgestellt. Die Blutgasanalyse beschrieb eine metabolische Alkalose (pH 7,452). Der Wert für Aldosteron lag im Normbereich. Die Sonographie der Nieren sowie die kardiologische Diagnostik waren unauffällig. Eine Therapie mit Kalium und Magnesium wurde begonnen.

3.1.1.4 4. Fallbeispiel: Patient mit Mutation V1015M

Im Alter von drei Jahren und vier Monaten wurde die Patientin im Rahmen rezidivierenden Erbrechens stationär aufgenommen. Innerhalb eines Jahres kam es zu mehrfachen Elektrolytentgleisungen und insgesamt sieben stationären Aufenthalten. Ansonsten präsentierte sich die Patientin in gutem Allgemeinzustand mit einer normalen körperlichen Entwicklung. Bei dem Mädchen wurde eine umfangreiche metabolische Diagnostik durchgeführt. Es fielen eine Hyponaträmie, eine Hypokaliämie, eine Hyochlorämie (keine Werte angegeben) und eine metabolische Alkalose auf. Zusätzlich wurden ein Hyperreninismus und ein erhöhter Serum-Aldosteron-Spiegel festgestellt. Die Sonographie der Nieren blieb unauffällig. Die Therapie bestand aus der oralen Substitution mit Kalium.

Tabelle 3-3: Zusammenfassung der klinischen Angaben bei den Fallbeispielen

Mutation	R135C homozygot	T180R homozygot	S614P homozygot	V1015M heterozygot
Alter bei Erstdiagnose	4 1/12 Jahre	25 Jahre	7 7/12 Jahre	3 4/12 Jahre
Symptome	Schlechter Appetit, Obstipation	Pektanginöse Beschwerden, Sinustachykardie	Wachstumsstörungen, Enuresis nocturna (Salmonellenenteritis)	Rezidivierendes Erbrechen
Laboruntersuchung:				
Hypokaliämie	+ (2,4mmol/l)	+ (2,3mmol/l)	+ (1,8 mmol/l)	+ (keine Angabe)
Hypochlorämie	- Normbereich	- Normbereich	+ (83mmol/l)	+ (keine Angabe)
Hypomagnesiämie	- Normbereich	+ (0,52mmol/l)	+ (keine Angabe)	Nicht gemessen
metabolische Alkalose	+ pH 7,44	+ pH 7,38	+ pH 7,45	+ (keine Angabe)
Aldosteron	erhöht	Normbereich	Normbereich	erhöht
Renin	erhöht	erhöht	-	erhöht

3.2 Funktionelle Analyse der Mutationen und Polymorphismen

Mittels ^{36}Cl -Uptake-Messungen nach Expression in *Xenopus* Oozyten wurden der Wildtyp, die identifizierten Mutationen und Polymorphismen funktionell analysiert. Die Experimente wurden insgesamt an 5 Oozytenpräparationen verschiedener Frösche wiederholt. Für jedes Experiment wurden je Konstrukt 12-15 Oozyten einer Präparation verwendet. Jeder einzelnen Oozyte wurden 20µg Wildtyp- oder mutierter NCCT-RNA injiziert. Für die Versuche wurde cRNA des Flag-markierten NCCT injiziert. Das Flag-Epitop diente der Protein-Detektion in weiteren Versuchen, wie Western Blot-Analysen und Immunofluoreszenz-Darstellung. Wie in vorherigen Studien demonstriert wurde, hat das FLAG Epitop am Aminotermus keinen Einfluss auf die Funktion des NCCT (De Jong *et al.*, 2002) und wurde deswegen in den Versuchen als Wildtypprotein eingesetzt. Die Chlorid-Uptakes wurden immer drei Tage nach der Injektion durchgeführt.

Abbildung 3-1 zeigt die Ergebnisse einer repräsentativen Messung, in welcher Oozyten desselben Frosches mit der cRNA des Wildtyps, der Mutationen und Polymorphismen injiziert wurden. Im Gegensatz zur nicht injizierten Kontrolloozyte konnte beim Wildtyp ein dreifacher Anstieg des ^{36}Cl -Aufnahmen beobachtet werden. Bei den untersuchten Mutationen hingegen zeigte sich keine signifikante ^{36}Cl -Aufnahme (siehe Abbildung 3-1: R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M). Somit konnten keine Restaktivitäten für die von mir analysierten mutierten NCCT-Konstrukte ausgemacht werden. Im Gegensatz dazu wurde bei den Polymorphismen ein Wildtyp-ähnlicher Uptake gemessen (siehe Abbildung 3-1: G264A, R904Q, R919C).

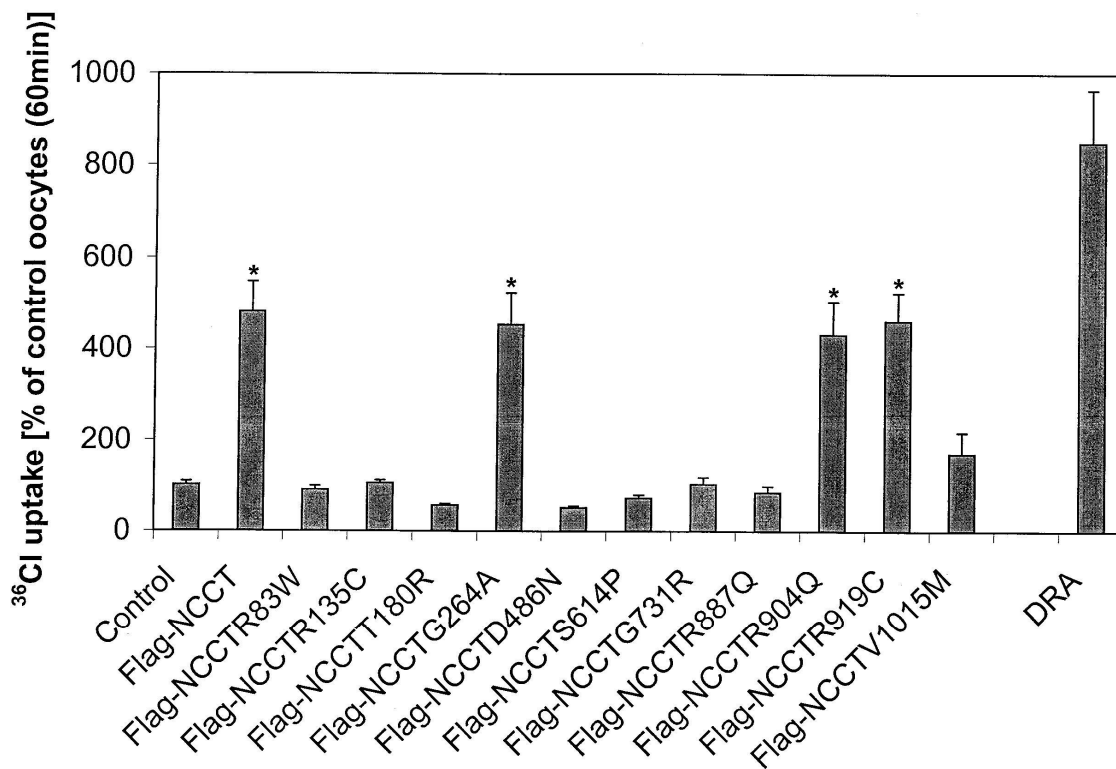


Abbildung 3-1: Funktionelle Analyse des Wildtyps (Flag-NCCT), der Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) und Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C).

Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert gemessener Chlorid-Uptakes von jeweils 12-15 Oozyten. Jede Oozyte wurde mit 10µg RNA injiziert. Der Chlorid-Uptake fand 60 Minuten statt. Jede Messung wurde auf den Mittelwert der Kontrollloozyten bezogen, die Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ festgesetzt und mit * markiert. Der Wildtyp zeigt zur Kontrolle einen signifikanten Anstieg. Bei den Mutationen kann kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Die Polymorphismen zeigen ähnlich dem Wildtyp einen signifikanten Anstieg im Gegensatz zur Kontrolle. Die Expression von DRA (Down Regulated in Adenoma; SLC26A3), einem $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, diente als Positivkontrolle zur Überprüfung der Analyse-methode.

3.3 Untersuchungen zum Pathomechanismus

Ursächlich für den hier beschriebenen Funktionsverlust der getesteten NCCT-Mutanten wären verschiedene Mechanismen denkbar. Erstens könnte eine reduzierte Proteintranslation die Transporterfunktion beeinträchtigen. Bei unveränderter Expressionsmenge des NCCT-Proteins könnte zweitens eine gestörte Oberflächenexpression des Proteins die Chlorid-Aufnahme in die Oozyten reduzieren (gestörtes Proteintrafficking). Die dritte Möglichkeit besteht in einem Funktionsverlust der intrinsischen Funktion und Regulation des Transporters bei sonst normal synthetisiertem und in die Membran inserierten Protein.

3.3.1 Proteintranslation

Um zu überprüfen, ob eine verminderte Proteintranslation oder –stabilität den Funktionsverlust erklärt, wurden Western Blot Analysen angefertigt, um das Proteinprodukt des Wildtyps mit dem der mutierten Konstrukte zu vergleichen.

Die Western Blot Untersuchungen wurden jeweils von zehn mit 10µg cRNA injizierten Oozyten pro Konstrukt angefertigt. Es wurden zwei unabhängige Western Blots angefertigt. Die Abbildung 3-2 demonstriert eine repräsentative Untersuchung des WT, der Mutationen, der Polymorphismen und einer nicht injizierten Kontrolle. Das Protein des NCCT bildet eine spezifische Bande bei 110 kD. Alle analysierten Mutationen (R83W, R135C, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) zeigten in beiden Western Blot Analysen die gleiche spezifische Bande von 110kD wie der WT-NCCT mit Ausnahme der Mutation T180R. Bei der Mutation T180R konnte nur eine sehr schwache spezifische Bande bei 110kD gesehen werden (siehe Abbildung 3-2).

Die Proteine der Polymorphismen zeigten keinen Unterschied zum Wildtyp in den Western Blot Untersuchungen.

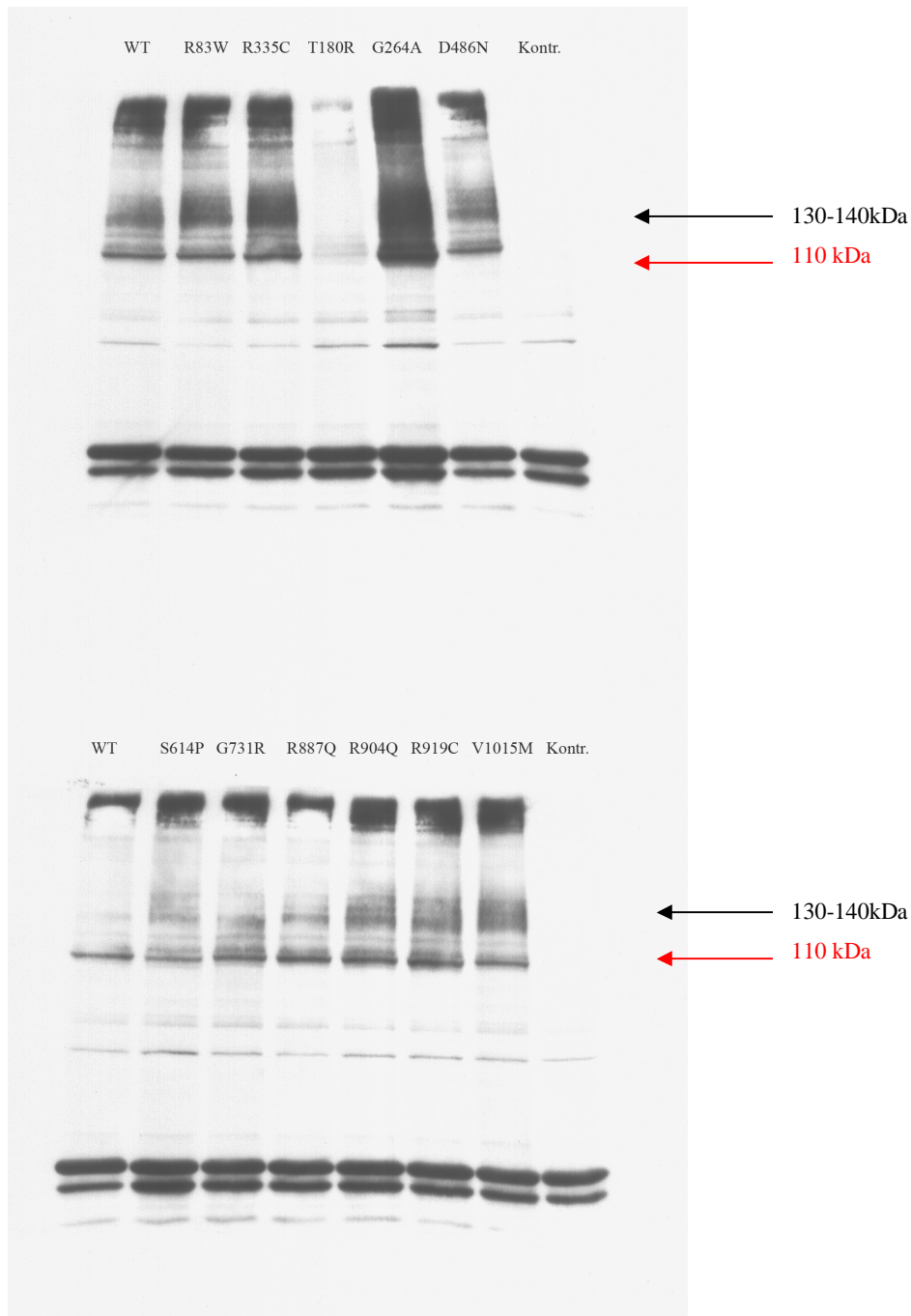


Abbildung 3-2: Western Blot der Kontrolle (Kontr.), des Wildtyps (WT), der Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) und der Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C).

Der **rote Pfeil** markiert das spezifische Proteinprodukt des NCCT bei **110kD**. Der WT, die Mutationen sowie die Polymorphismen weisen diese Bande auf. Mit Ausnahme der T180R Mutation. Hier ist die spezifische Bande bei 110kD nur schwach zu sehen. Die unscharfe Bande im Bereich von 130-140 kDa führen wir auf höhermolekulare, glykosylierte NCCT Moleküle zurück.

3.3.2 Proteintrafficking

Um zu überprüfen, ob ein gestörter Einbau in die Zellmembran ursächlich für die verminderte Aufnahme verantwortlich ist, stellte ich die Membranexpression der verschiedenen Mutationen mit Hilfe des Flag-Antikörpers durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie dar. Bei diesem Versuch wurden die Polymorphismen nicht berücksichtigt, da sie in den vorherigen Versuchen keinen Unterschied zum WT aufwiesen.

Bei den Immunfluoreszenzanfärbungen der Oozyten wurden jeweils 10µg Flag-tagged NCCT cRNA injiziert. Die Abbildung 3-3 zeigt die deutlichen Signale des Flag-NCCT Wildtyps in der Zellmembran. Im Gegensatz dazu konnte bei der nicht injizierten Kontrolloozyte weder auf der Oberfläche noch im Cytoplasma Anfärbungen beobachtet werden (Abbildung 3-4). Wie in den Abbildungen 3-5 bis 3-8 zu sehen, zeigten die mutierten Flag-NCCT Proteine eine sehr unterschiedliche Expression in der Oozytenmembran.

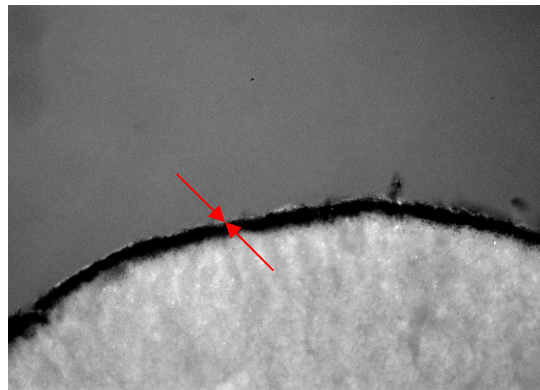


Abbildung 3-3: Wildtyp

Die **roten Pfeile** markieren den hell angefärbten Flag-NCCT in der Plasmamembran. Im Cytoplasma sind keine Signale nachweisbar. Der unter der Zellmembran dargestellte dunkle Streifen entspricht einer intensiven Pigmentansammlung am vegetativen Pol der Oozyte.

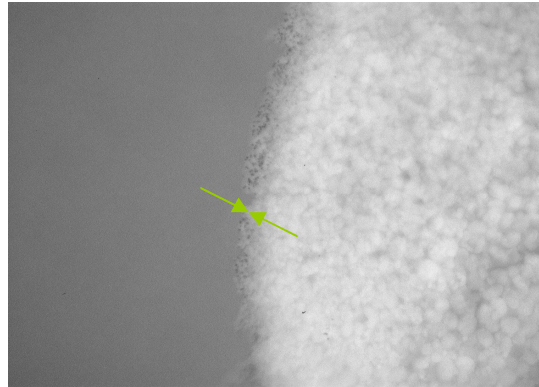


Abbildung 3-4: Kontrolle

Die **grünen Pfeile** markieren die Plasmamembran auf der wenig pigmentierten (animalischen) Seite der Oozyte. Weder auf der Plasmamembran noch im Cytoplasma sind Signale zu sehen.

Die Mutation T180R ließ sich analog zur Western Blot Darstellung auch in der Immunfluoreszenz nicht anfärben, das Bild ist ähnlich wie bei der Kontrolle. Es konnten weder auf der Plasmamembran noch im Cytoplasma Signale festgestellt werden (Abbildung 3-5).

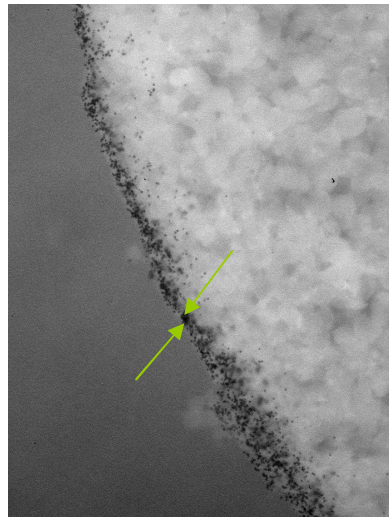


Abbildung 3-5: T180R

Die **grünen Pfeile** markieren die Plasmamembran auf der dunkel pigmentierten Seite der Oozyte. Weder auf der Plasmamembran noch im Cytoplasma kann ein Flag-markiertes Protein angefärbt werden.

Das Protein der Mutation R83W war im Gegensatz zum Wildtyp-Protein nicht auf der Oberflächenmembran zu finden. Es kam jedoch zu Signalen im Cytoplasma der Oozyte (Abbildung 3-6).

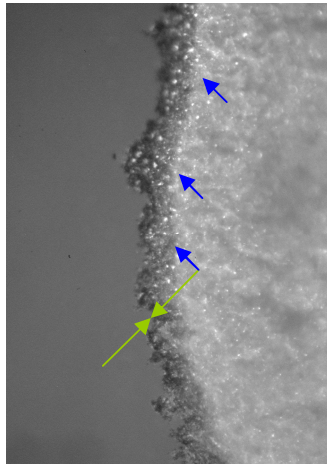


Abbildung 3-6: R83W

Die **grünen Pfeile** markieren die Plasmamembran auf der dunkel pigmentierten Seite der Oozyte, hier sind keine Signale zu sehen. Die **blauen Pfeile** markieren Signale, die innerhalb des Cytoplasmas liegen.

Die Proteine der Mutationen G731R, Q887R und V1015M konnten auf der Oberfläche sowie auch im Cytoplasma angefärbt werden (Abbildung 3-7).

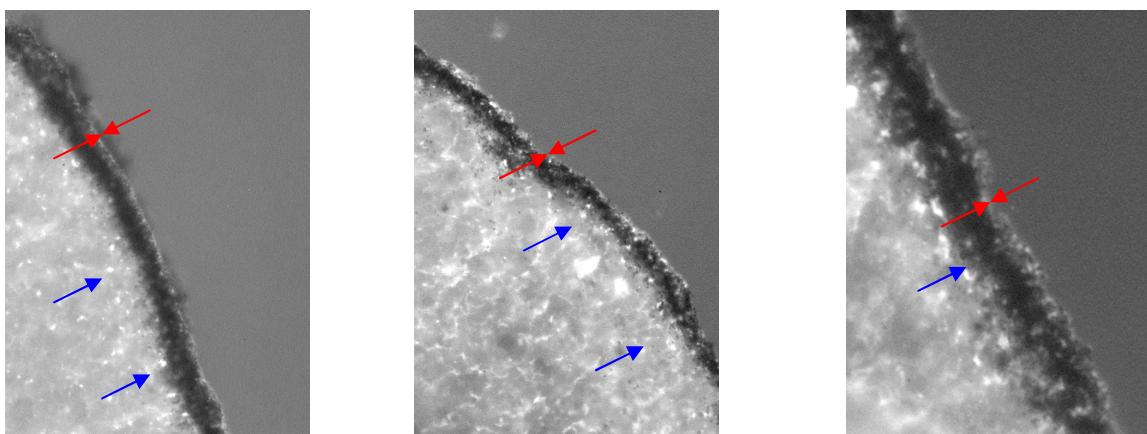


Abbildung 3-7: Links G731R, Mitte Q887R, Rechts V1015M.

Die **roten Pfeile** markieren die Signale auf der Oberfläche der dunkel pigmentierten Seite der Oozyten, die **blauen Pfeile** die Signale im Cytoplasma.

Die Mutationen R135C, D486N und S614P zeigten ein wildtyp-ähnliches Anfärbemuster. Hier konnte man deutliche Immunfluoreszenzsignale auf der Plasmamembran sehen, während im Cytoplasma so gut wie keine Signale zur Darstellung kamen.

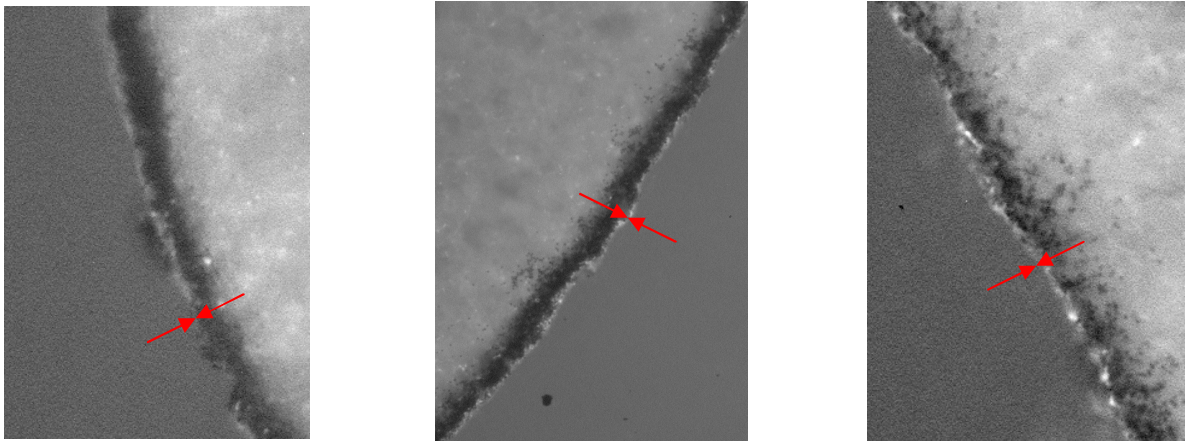


Abbildung 3-8: Links R135C, Mitte D486N, Rechts S614P

Die **roten Pfeile** markieren die Immunfluoreszenz auf der Oberflächenmembran. Im Cytoplasma sind kaum Signale zu sehen.

3.3.3 Regulation der Transporteraktivität

Der Funktionsverlust der Mutationen könnte auch auf einen Verlust der intrinsischen Aktivität oder auch der Regulationsfähigkeit des Transporters basieren. Um dieses zu testen wurden funktionelle Analysen mit der WNK1 mittels ^{36}Cl -Uptake Messungen angefertigt. Die Versuche wurden genauso durchgeführt wie die funktionellen Analysen der Mutationen allein, nur wurde jetzt die cRNA der WNK1 bei jedem Konstrukt mit injiziert.

Der WT-NCCT zeigte unter der Koinjektion mit WNK1 eine vier- bis fünffache Steigerung des Chlorid-Uptakes im Vergleich zum Uptake ohne WNK1. Dieser stimulierende Effekt der WNK1 auf die NCCT-Aktivität wurde in mehr als 6 Messungen bestätigt. Die Koexpression der

funktionslosen NCCT Mutationen mit der WNK1 zeigte dagegen nur einen unbedeutenden Zuwachs des Chloriduptakes. Die Polymorphismen reagierten unter der WNK wie erwartet mit einer Steigerung der Chloridaufnahme ähnlich dem Wildtyp.

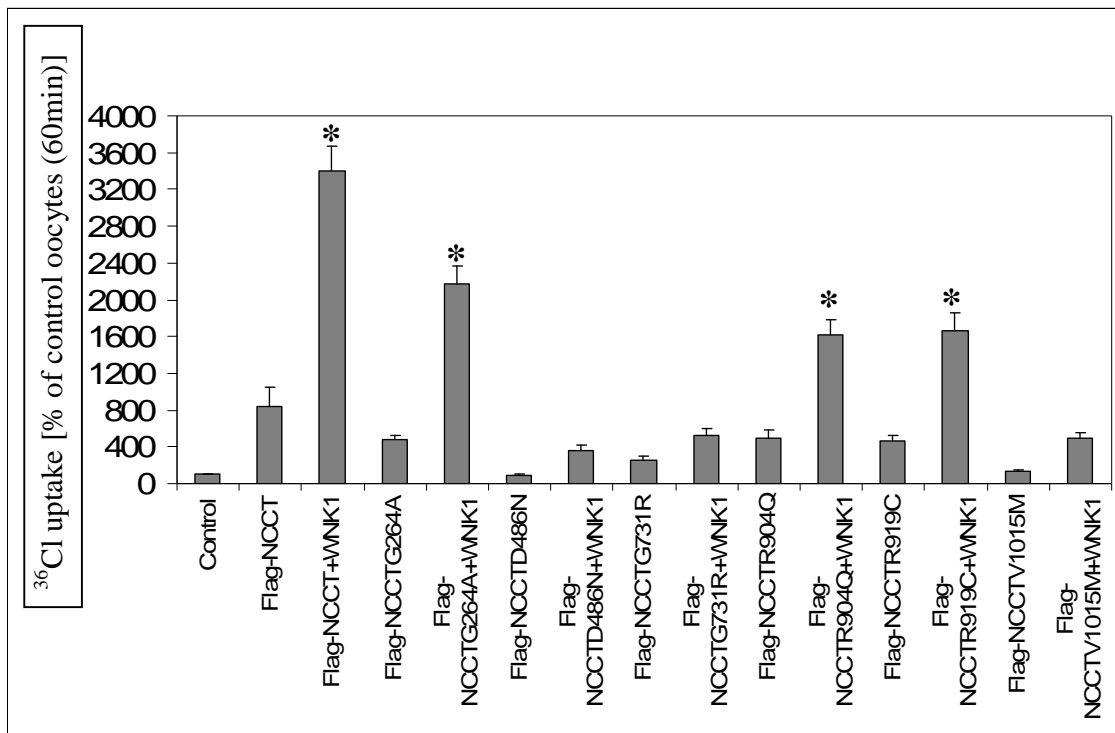


Abbildung 3-9: Funktionelle Analyse mit der WNK1

Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert gemessener Chlorid-Uptakes von jeweils 12-15 Oozyten. Jede Oozyte wurde mit jeweils 20µg RNA des NCCT und der WNK1 koinjiziert. Der Chlorid-Uptake fand 60 Minuten statt. Jede Messung wurde auf den Mittelwert der Flag-NCCT exprimierenden Oozyten bezogen, die Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ festgesetzt. Koexpression des NCCT mit WNK zeigt einen signifikanten Anstieg, der auch für die getesteten Polymorphismen beobachtet wurde. Keinen signifikanten Anstieg nach WNK-Koexpression zeigten die NCCT-Mutanten. Aus Praktikabilitäts-Gründen wurde eine exemplarische Auswahl der untersuchten NCCT-Mutanten getroffen, weil mit dem bestehenden System nur maximal 15 Konstrukte gleichzeitig getestet werden konnten.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Trotz der klinisch unterschiedlichen Schweregrade des Gitelman Syndroms konnte bei keiner der untersuchten Mutationen eine Restaktivität nachgewiesen werden. In der Tabelle 3-4 sind die Ergebnisse der Versuche zum Pathomechanismus, der dem Funktionsverlust zugrunde liegt, zusammengefasst. Alle Mutationen, mit Ausnahme der T180R Mutation, konnten im Western Blot dargestellt werden. In der Immunfluoreszenz konnten die mutierten Transporter in unterschiedlichen Lokalisationen angefärbt werden, was Rückschlüsse auf den Pathomechanismus erlaubt. Die funktionellen Untersuchungen mit der WNK1 konnten keine Stimulation der mutierten Transporter darstellen.

Die Polymorphismen reagierten in allen Versuchen wie der Wildtyp.

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Pathomechanismus

Mutation	Funktion	Protein-translation	Lokalisation in der Immunfluoreszenz	Stimulation durch die WNK1
WT	+	+	Plasmamembran	+
R83W	-	+	Cytoplasma	-
R135C	-	+	Plasmamembran	-
T180R	-	-	-	-
D486N	-	+	Plasmamembran	-
S614P	-	+	Plasmamembran	-
G731R	-	+	Plasmamembran und Cytoplasma	-
Q887R	-	+	Plasmamembran und Cytoplasma	-
V1015M	-	+	Plasmamembran und Cytoplasma	-

4 Diskussion

4.1 Diskussion der angewandten Methode

Für die Versuche wurde die Oozyte des südafrikanischen Krallenfrosches als Expressionssystem gewählt. Dieses Translationssystem ermöglicht das Expressieren von heterologen Proteinen nach cRNA-Injektion (Soreq 1992). Das System hat sich für elektrophysiologische Untersuchungen von Membranproteinen bereits vielfach bewährt. Vorteile dieses Systems zur Proteinsynthese sind, dass die Oozyten leicht und in großen Mengen zu gewinnen sind und sich aufgrund der Größe gut manipulieren lassen. Bedingt durch die große Zahl von Ribosomen weisen die Eizellen eine große translationale Kapazität auf. Die posttranslationalen Modifikationsprozesse, wie Phosphorylierung und Glykosylierung, sind denen der menschlichen Zelle ähnlich (Soreq 1985). So kann eine einzige Zelle Aufschluß über Transportprozesse ermöglichen.

Nachteil ist, dass die Oozytenqualität saisonal stark variiert, besonders bei hohen Außentemperaturen sind die Eizellen empfindlich und liefern schwankende Ergebnisse. Die Vorbereitung und Injektion stellen eine starke Beanspruchung für die Zelle dar, hierbei kann die Zelle selbst bzw. intrazelluläre Strukturen beschädigt werden. So können nicht nur die Ergebnisse verschiedener Frösche und Meßreihen schwanken, sondern auch die Ergebnisse einer Messung desselben Frosches.

Eine völlige Gleichsetzung des heterologen Modells mit einer Säugerzelle kann nicht erreicht werden, da möglicherweise unterschiedliche Reaktionskaskaden nicht in der Oozyte vorhanden sind. Außerdem liegt das Temperaturoptimum für menschliche Proteine bei einer Körpertemperatur von 37°C. Die Experimente dieser Untersuchung allerdings finden bei Raumtemperatur statt. Das kann die Kinetik und das temperaturempfindliche Protein-Trafficking der Membranproteine verändern. Die niedrige Temperatur stellt gleichzeitig das Funktionieren des Translationssystems der Oozyte sicher.

Aufgrunddessen besteht die Möglichkeit, dass bei Versuchen mit einer Säugerzelle eventuell noch Restaktivitäten nachweisbar wären.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschreibt die funktionellen Analyse, die Proteinbildung und die Oberflächenexpression von acht neuen Mutationen im SLC12A3 Gen bei Gitelman Patienten. Zusätzlich wurden auch drei Polymorphismen des Natrium-Chlorid-Cotransporters untersucht. Schließlich sollte anhand dieser Ergebnisse und der vorliegenden klinischen Daten dargestellt werden, ob eine Korrelation zwischen den einzelnen „in vitro“ Untersuchungen und der Krankheitsausprägung („in vivo“) besteht.

4.2.1 Klinische Daten

Das Gitelman Syndrom wird häufig zur Abgrenzung zu den anderen Salzverlusterkrankungen der Niere als eine milde und sich spät manifestierende Krankheitsvariante beschrieben (Monnens *et al.*, 1998). Die Erkrankung weist eine hohe phänotypische Varianz auf. Das Manifestationsalter variiert extrem zwischen dem sechsten und sechzigsten Lebensjahr (Jeck *et al.*, 2000). Fallberichte von Patienten aus anderen Arbeiten berichten von asymptomatischen Patienten und milden unspezifischen Symptomen wie Tetanien, Muskelschwäche, Müdigkeit und schwache neuromuskuläre Symptome (Lemmink *et al.*, 1998; Rudin, 1988; Bettinelli *et al.*, 1995). Cruz und seine Arbeitsgruppe konnten mit einer Evaluation von Symptomen und einem Fragebogen zur Lebensqualität von Gitelman Patienten jedoch zeigen, dass nicht einer der befragten Patienten in der Studie komplett asymptomatisch war (Cruz *et al.*, 2001 (Kidney int.)). Es wurde beschrieben, dass das Problem häufig bei den untersuchenden Ärzten lag, da diese häufig „keine Symptome“ notierten. Außerdem muss man davon ausgehen, dass jeder Patient seine Symptome unterschiedlich wahrnimmt und beurteilt.

Die vorliegenden Patientendaten der zu untersuchenden Gitelman Mutationen sind vor diesem Hintergrund kritisch zu beurteilen. Die Variabilität des Krankheitsbildes widerspiegelt sich also nicht nur in den Labordaten, sondern auch in der patienteneigenen Wahrnehmung der Symptome und der Vollständigkeit der Befragung und Dokumentation der Symptome durch den Arzt. So kann man aufgrund unserer

retrospektiven Erhebung, die auf den Befundberichten externer Ärzte basiert, nicht sicher davon ausgehen, dass bei den vorgestellten Patienten nicht vielleicht doch weitere klinische Symptome bei der Erstmanifestation existierten. Außerdem kann nicht festgestellt werden, ob vielleicht schon vor der dokumentierten Erstmanifestation Symptome bestanden, die von den Patienten nicht als solche wahrgenommen wurden oder von den behandelnden Ärzten falsch interpretiert worden sind. Labordaten kann man am ehesten miteinander vergleichen, aber auch diese sollten kritisch beurteilt werden, da die Laborentnahmen unter verschiedenen Voraussetzungen und Krankheitszuständen stattfanden. Die Patienten aus den Fallbeispielen kamen beispielsweise alle unter anderen Voraussetzungen zur stationären Aufnahme. So sind Labordaten der Elektrolyte von symptomatischen Patienten mit Gastroenteritis oder rezidivierenden Erbrechen schwierig mit Routinekontrollen bei Patienten mit Obstipation zu vergleichen. Bei den Patienten mit Magen-Darm-Infektion muss davon ausgegangen werden, dass der Elektrolytverlust nicht alleine durch das Gitelman Syndrom hervorgerufen wurde. Auch die Labordaten des Patienten mit den Herzrhythmusstörungen, basierend auf der Elektrolytinbalance, können schlecht mit den Daten der anderen Patienten verglichen werden, da der Patient bereits „symptomatisch“ war. So zeigt sich, dass die Variabilität des Krankheitsbildes von vielen „Variablen“ abhängt, die schwer zu vergleichen sind. Angemerkt werden muss in diesem Zusammenhang, dass uns nicht von jedem Patienten Daten vorlagen.

4.2.2 Funktionelle Daten

Die funktionellen Daten zu den NCCT-Mutationen und Polymorphismen basieren auf ³⁶Chlorid Uptake-Messungen. Die Ergebnisse sagen aus, dass alle untersuchten Mutationen, trotz eines Wildtyp-ähnlichen Proteinprodukts in der Western Blot Untersuchung, zu einem vollständigen Funktionsverlust des Natrium-Chlorid-Cotransporters führen. Es konnte bei keiner der untersuchten Mutationen eine Restaktivität festgestellt werden. Die Polymorphismen zeigten wie erwartet die gleiche Transporteraktivität wie der Wildtyp. Die funktionellen Untersuchungen wurden mit Hilfe des heterologen Expressionssystems in *Xenopus* Oozyten durchgeführt. Dieses

System ist eine etablierte Methode, die schon von vielen anderen Arbeitsgruppen mit Erfolg angewandt worden ist (Gamba *et al.*, 1994; Gamba *et al.*, 1993; Hoover *et al.*, 2003; Monroy *et al.*, 2000; De Jong *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). Die Expression von endogenen Membranproteinen in *Xenopus* Oozyten ist im Allgemeinen unbedeutend gering im Vergleich zu der hohen exogenen Expression nach cRNA Injektion (Busch *et al.*, 1996). Die Qualität der Oozyten hängt von dem präparierten Frosch, der Präparation selbst, der Umgebungstemperatur und dem Alter der Oozyten ab. Zerstörte und abgestorbene Zellen konnten aber schnell unter dem Mikroskop erkannt und aussortiert werden. Zu bedenken ist auch die Qualität der cRNA, die hoch empfindlich ist, was Einfluss auf die Expressionsrate und damit auf den Chlorid-Uptake haben könnte. Um trotzdem aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurde je Versuch immer der Mittelwert von 15 Oozyten pro Konstrukt ermittelt. Außerdem wurden mehrere Versuche mit Oozyten verschiedener Frösche durchgeführt.

4.2.3 Potentieller Pathomechanismus

Neben der funktionellen Analyse des NCCT, der Mutationen und Polymorphismen sollte auch der zugrunde liegende Pathomechanismus, der zum Funktionsverlust führte, untersucht werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, warum eine Mutation zu einem Funktionsverlust des Transporters führen könnte. Die Möglichkeiten sind: 1. eine gestörte Proteintranslation, 2. eine Störung in der Proteinweiterverarbeitung und im intrazellulären Weitertransport, 3. eine gestörte Oberflächenexpression, 4. eine gestörte intrinsische Aktivität des Transporters und 5. ein gesteigerter Abbau des Transporters.

4.2.3.1 Gestörte Proteintranslation

Eine Möglichkeit besteht in der fehlenden Proteinsynthese. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Proteine mit Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stoppcodon führen oder die durch eine Deletion nicht mehr gebildet werden können, keine Funktion mehr

aufweisen (Syren *et al.*, 2002). Zu solchen Mutationen liegen für den NCCT bisher jedoch noch keine funktionellen Analysen vor. In dieser Arbeit beobachteten wir für die NCCT Mutation T180R nur ein sehr schwaches Signal in der auf Proteinebene in der Western Blot Analyse. Bei dieser Mutation liegt lediglich eine Punktmutation vor, die zu einem Austausch von Threonin zu Arginin auf Aminosäureebene führt. Hier wäre also annehmbar, dass NCCT T180R entweder nicht gebildet oder rasch abgebaut worden ist.

Nicht komplett auszuschließen ist die Möglichkeit, dass die Oozyte das Protein nicht gebildet hat, weil die cRNA des entsprechenden Konstruktes verunreinigt oder degradiert war. Um die cRNA auf ihre Integrität zu kontrollieren wurden die Konzentrationen jeder cRNA mittels Extinktion bestimmt und die Integrität mittels Gelelektrophorese geprüft. Es besteht jedoch theoretisch die Möglichkeit von Verunreinigungen beispielsweise durch Nukleasen im Anschluss an die Kontrolluntersuchungen. Auch mit neu synthetisierter cRNA wurden jedoch ähnliche Resultate erhoben, sodass die Möglichkeit einer Degradierung eher als unwahrscheinlich eingestuft werden kann.

4.2.3.2 Gestörte Oberflächenexpression

In der aktuellen Arbeit konnten die Proteine von sechs (R135C, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) der acht getesteten Mutationen in der Plasmamembran nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu früher beschriebenen NCCT-Mutationen, deren Aktivität mit dem Ausmaß der Membranexpression korrelierte (Sabath *et al.*, 2004) beobachtete ich bei keiner der von mir getesteten Mutanten eine Restaktivität. Hier scheint es daher qualitative Unterschiede abhängig von der Art der Mutation zu geben. Abhängig von der Mutation konnten zudem Unterschiede in der Art der Membranexpression beobachtet werden. Für die Mutationen G731R, Q887R und V1015M wurde eine Expression innerhalb der Zellmembran sowie eine schollige Akkumulation im Zytoplasma beobachtet. Bei der auffälligen zytoplasmatischen Akkumulation könnte es sich um degradierte, fehlgefaltete Proteine handeln, die entweder die Zellmembran nicht erreichen oder aber rasch aus dieser entfernt werden. Unter Umständen liegt darin der

Grund für die verminderte Transportaktivität dieser Proteine. Weiterführende Untersuchungen zur Halbwertszeit dieser Proteine bzw. zu deren Kompartimentierung in intrazellulären Kompartimenten wären erforderlich, um diese Frage abschließend zu beantworten. Die Mutationen R135C, D486N und S614P waren in ihrer Oberflächeexpression nicht vom Wildtyp zu unterscheiden. Hier fand sich auch keine auffällige zytoplasmatische Akkumulation, sodass am ehesten von einem echten, intrinsischen Funktionsverlust des NCCT-Proteins als Ursache der beobachteten Transportstörung auszugehen ist. Die erste Studie über funktionelle Analysen und pathophysiologische Untersuchungen von Mutationen beim Gitelman Syndrom wurde von Kunchaparty und seiner Arbeitsgruppe veröffentlicht (Kunchaparty *et al.*, 1999). Genauso wie in der aktuellen Arbeit konnten keine Restaktivitäten bei den mutierten Transportern festgestellt werden. Kunchaparty begründete dieses durch Western Blot Analysen, in denen er nachwies, dass bei den mutierten Transportern keine Glykosylierung des Proteins bei 130-140kD stattgefunden hatte. Zusätzlich fertigte er Immunfluoreszenzanfärbungen an, um die Expression in der Plasmamembran darzustellen. Die mutierten Transporter konnten im Gegensatz zur aktuellen Arbeit nicht innerhalb der Membran nachgewiesen werden. Die Schlussfolgerung dieser Arbeitsgruppe als Begründung für den Funktionsverlust war, dass die Mutationen vor allem in den Mechanismus der Proteinweiterverarbeitung (Glykosylierung) eingreifen. Auch schon bei anderen Membranproteinen verschiedener Zellen konnte die fehlende Glykosylierung als Ursache für einen Funktionsverlust gefunden werden (Asano *et al.* 1993; Fishburn *et al.*, 1995).

Eine darauf folgende Studie zu diesem Thema untersuchte nur Mutationen auf ihre Transporteraktivität, wenn sie sich in der Western Blot Untersuchung nicht vom Wildtyp unterschieden (De Jong *et al.*, 2002). Es konnte interessanterweise beobachtet werden, dass die mutierten glykosylierten Transporter nicht zu einem kompletten Funktionsverlust führten, sondern eine Restfunktion besaßen. Außerdem konnten die Proteine mit Hilfe der Immunfluoreszenz im Cytoplasma und innerhalb der Plasmamembran angefärbt werden. Diese Arbeitsgruppe kam zu der Schlussfolgerung, dass bei manchen Mutationen die Weiterverarbeitung des Proteins nach der Glykosylierung der ursächliche Grund für die herabgesetzte Aktivität des NCCT war.

Zu einem anderen Schluß kamen aufgrund ihrer Daten Sabath und seine Arbeitsgruppe. Ihrer Meinung nach war anhand der Versuche von De Jong nicht mit Sicherheit zu differenzieren, ob die mutierten Transporter nun zu einer herabgesetzten Oberflächenexpression oder zu einem Defekt der Transportereigenschaften selbst führten. Um diesbezüglich sicherere Aussagen machen zu können, fertigten Sabath und seine Arbeitsgruppe ausführliche Versuche zu der Pathophysiologie von Gitelman Mutationen an (Sabath *et al.*, 2004). Sie untersuchten genauso wie die Arbeitsgruppe von De Jong nur mutierte Proteine, die eine Restfunktion aufwiesen und in der Western Blot Untersuchung eine wildtyp-ähnliche Proteinsynthese zeigten. Anschließend untersuchten sie die Oberflächenexpression eines EGFP-markierten NCCT Wildtyp und EGFP-markierter mutierter Proteine. Sie konnten eine signifikante Reduktion der Oberflächenexpression der mutierten Proteine im Gegensatz zum Wildtyp feststellen. Außerdem war es ihnen möglich mit Hilfe von quantitativen Laserscans nachzuweisen, dass das Ausmaß des Na^+ Uptakes mit der Quantität der Membranexpression korrelierte. Daraus schlossen sie, dass der Grund für den Funktionsverlust nicht in der Transporterfunktion selbst zu suchen ist, was sie mit Kinetik Versuchen belegten, sondern in dem gestörten Einbau in die Plasmamembran liegt.

Dass der Einbau des NCCT in die Zellemban ein wichtiger Kontrollpunkt für die Steuerung der Transporterfunktion ist, konnte in vorherigen Studien zur Regulation der NCCT-Aktivität durch die WNK4 Proteinkinase, einem negativen Regulator des NCCT, gezeigt werden. Eine Mutation der WNK4 führt zu einer fehlenden Inhibition des Transporters, indem es zu einer Überexpression des Proteins in der Plasmamembran kommt (Wilson *et al.*, 2003; Yang *et al.* 2003). Einen gleichgerichteten stimulatorischen Effekt auf die NCCT-Transportaktivität konnten wir in diesem Zusammenhang auch für die WNK1 Proteinkinase nachweisen. Bislang wurde vermutet, dass der Effekt der WNK1 Kinase auf die NCCT-Aktivität ausschließlich über eine Inhibition der WNK4-Kinase vermittelt wird. Unsere Experimente zeigen einen direkten Effekt von WNK1 auf NCCT, wennauch wir nicht mit Sicherheit die endogene Expression eines WNK4-homologen Proteins in *Xenopus* Oozyten ausschließen können. Unter der Annahme, dass gleichgerichtet zu WNK4 auch WNK1 die NCCT-Aktivität vornehmlich über einen verstärkten Einbau in die Plasmamembran reguliert, interpretieren wir unsere Resultate zur fehlenden Stimulierbarkeit der von uns getesteten NCCT-Mutanten durch

WNK1 eher im Sinne einer gestörten intrinsischen Transportaktivität des NCCT-Proteins.

4.2.3.3 Gestörte intrinsische Aktivität des Transporters

Eine weitere Möglichkeit besteht in der gestörten intrinsischen Transporterfunktion selber. Bei den drei Mutationen (R135C, D486N, S614P) kann der Verlust der Transporterfunktion nicht an der Oberflächenexpression liegen, da sie sich, wie oben erwähnt, in ihrer Oberflächenexpression nicht vom WT unterscheiden. Interessanterweise wurde auch schon bei anderen mutierten Transportern wie dem strukturell mit dem NCCT verwandten NKCC2 eine Störung der intrinsischen Aktivität als Grund für den Funktionsverlust festgestellt (Starremans *et al.*, 2003). Die mutierten Proteine wurden normal synthetisiert und konnten ebenfalls innerhalb der Plasmamembran nachgewiesen werden. Bislang noch fehlende Erkenntnisse zur Kristallstruktur des NCCT-Proteins machen eine Aussage über mögliche Konsequenzen auf die Proteinfunktion der genannten Mutationen unmöglich. Denkbar wären direkte Effekte auf die Substratbindung, Substrattranslation über die Membran oder aber zur Assoziation zu multimeren Proteinkomplexen. Zukünftige Untersuchungen zur Struktur-Funktionsbeziehung dieser Transportproteine werden genauere Aussagen bezüglich dieser Punkte ermöglichen.

4.2.4 Schlussfolgerung

Die zu untersuchenden neuen Gitelman Mutationen im NCCT Protein konnten als funktionell bedeutsame Mutationen identifiziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Mutationen zu einem kompletten Funktionsverlust des NCCT führen. Somit konnte ein möglicher Zusammenhang zwischen Restaktivitäten und der ausgeprägten phänotypischen Variabilität für die dargestellten Mutationen in dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Die getesteten Polymorphismen scheinen sich nicht von der Wildtypaktivität zu unterscheiden, erfüllen somit auch auf Funktions-Ebene die Voraussetzungen für einen neutralen Polymorphismus.

Analysen der verschiedenen Möglichkeiten zum Pathomechanismus brachten weitere Erkenntnisse. Western Blot Analysen konnten die Beeinträchtigung der Proteinsynthese und Proteininstabilität als Grund für den Funktionsverlust bei sieben Mutationen ausschließen. Die Mutation T180R zeigte im Western Blot Versuch wiederholt fehlende Signale im Bereich des zu erwartenden Proteins bei 110 kD, so dass die Vermutung nahe liegt, dass die Mutation zu einer gestörten Proteinsynthese oder zu einem rascheren Protein-Abbau führt.

Untersuchungen zur Oberflächenexpression des Transporters konnten den Grund für die Störung der Transporterfunktion für die Mutation R83W verantwortlich machen. Das mutierte Protein (R83W) konnte nicht in der Plasmamembran detektiert werden, so dass man bei der Mutation davon ausgehen muss, dass der fehlende Einbau in die Membran aufgrund von einer Störung der Proteinweiterverarbeitung innerhalb der Zelle Grund für den Funktionsverlust ist.

Die Mutationen G731R, Q887R und V1015M zeigten sowohl Signale in der Zellmembran der Oozyte als auch im Cytosol. Bei diesen Mutationen kann als Begründung für die fehlende Aktivität des Transporters ein verminderter Einbau oder ein vermehrter Umsatz des Proteins in der Membran der Oozyte verantwortlich sein. Bei den Mutationen R135C, D486N und S614P, die scheinbar in der Oberflächenexpression nicht von dem Wildtyp zu unterscheiden sind, muss eine

Störung auf funktioneller Ebene vorliegen. Coexpression von WNK1 zur Stimulation des Membran-Einbaus von NCCT zeigte bei keiner der genannten Mutationen einen Effekt auf die Transportaktivität. Somit scheint auch bei den von uns beschriebenen Trafficking-Mutationen ein zusätzlicher intrinsischer Transportdefekt vorzuliegen.

Diese Erläuterungen machen deutlich, dass verschiedene Ursachen für den Funktionsverlust des NCCT bei unterschiedlichen Mutationen vorliegen können. Es ist bisher nicht möglich eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erkennen. Art und Position der Mutation lassen bislang noch keine Rückschlüsse auf die Schwere des Krankheitsbildes zu.

5 Zusammenfassung

Das Gitelman Syndrom ist eine autosomal rezessiv vererbte renale Tubulopathie, die durch eine hypokaliämische Alkalose, eine Hypomagnesiämie und eine Hypocalciurie charakterisiert ist. Die Erkrankung basiert auf Mutationen im SLC12A3 Gen, das für den Natrium-Chlorid-Transporter (NCCT) im distalen Abschnitt des Tubulussystems der Niere kodiert. Funktionelle Untersuchungen mittels ^{36}Cl -Uptakes sowie Untersuchungen zur Proteinbiochemie mittels Western Blot und Immunfluoreszenz wurden durchgeführt, um den Effekt von acht neu beschriebenen Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) auf die NCCT-Funktion zu analysieren. Nach heterologer Expression des Wildtyps und der Mutationen in Eizellen des Krallenfrosches *Xenopus laevis* zeigten die Mutationen keine signifikant gesteigerte Chloridaufnahme. Bei keiner der Mutationen konnte eine Restaktivität der Transportfunktion nachgewiesen werden. In den Western Blot Untersuchungen konnte kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und den Mutationen dargestellt werden: alle, bis auf die Mutation T180R, wiesen eine spezifische Bande bei 110kD auf. Die Oberflächenexpression wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die Mutationen unterschieden sich in ihrer Oberflächenexpression. Die Mutation T180R konnte passend zum Ergebnis der Western Blot Analyse nicht mit Hilfe der Immunfluoreszenz angefärbt werden. Die Mutation R83W konnte nur im Cytoplasma der Zelle nachgewiesen werden. Die Mutationen G731R, R887Q und V1015M zeigten sowohl Signale im Cytoplasma als auch in der Plasmamembran. Nicht zu unterscheiden vom Wildtyp und fast ausschließlich nur in der Plasmamembran anzufärben, waren die Mutationen R135C, D486N und S614P. Weitere funktionelle Untersuchungen mit Hilfe der WNK1 zeigten, dass im Gegensatz zum Wildtyp die mutierten NCCT Proteine nicht aktiviert wurden. Zusammenfassend stellt diese Studie dar, dass der Grund für den Funktionsverlust der mutierten NCCT Transporter in unterschiedlichen Mechanismen zu suchen ist: in der gestörten Proteinsynthese (T180R), in der gestörten Proteinweiterverarbeitung (R83W), in dem gestörten Einbau in die Plasmamembran (G731R, R887Q und V1015M) oder in der intrinsischen Aktivität des Transporters (R135C, D486N und S614P). Eine Korrelation zwischen dem Genotyp und der

Krankheitsausprägung bei den Gitelman Patienten kann mit dieser Studie nicht gezeigt werden.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- Asano T, Takata K, Katagiri H, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Hirano H, Yazaki Y, Oka Y. (1993). „The role of N-glycosylation in the targeting and stability of GLUT1 glucose transporter.“ FEBS Lett 324:258-261.
- Bartter FC, Pronove P, Gill JR, Jr., Maccardle RC (1962). "Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome.“ Am J Med 33:811-828.
- Bettinelli A, Bianchetti MG, Borella P, Volpini E, Metta MG, Basilico E, Selicorni A, Bargellini A, Grassi MR (1995). "Genetic heterogeneity in tubular hypomagnesemia-hypokalemia with hypocalcuria (Gitelman's syndrome).“ Kidney Int 47:547-551.
- Bettinelli A, Bianchetti MG, Girardin E, Caringella A, Cecconi M, Appiani AC, Pavanello L, Gastaldi R, Isimbaldi C, Lama G, et al (1992). "Use of calcium excretion values to distinguish two forms of primary renal tubular hypokalemic alkalosis: Bartter and Gitelman syndromes.“ J Pediatr 120:38-43.
- Bettinelli A, Toso C, Colussi G, Tommasini G, Edefonti A, Bianchetti MG (2002). "Electrocardiogram with prolonged QT interval in Gitelman disease.“ Kidney Int 62:580-584.
- Bettinelli A, Vezzoli G, Colussi G, Bianchetti MG, Sereni F, Casari G (1998). "Genotype-phenotype correlations in normotensive patients with primary renal tubular hypokalemic metabolic alkalosis.“ J Nephrol 11:61-69.

- Birkenhager R, Otto E, Schurmann MJ, Vollmer M, Ruf EM, Maier-Lutz I, Beekmann F, Fekete A, Omran H, Feldmann D, Milford DV, Jeck N, Konrad M, Landau D, Knoers NV, Antignac C, Sudbrak R, Kispert A, Hildebrandt F (2001). "Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure." Nat Genet 29:310-314.
- Bockenhauer D, Feather S, Stanescu HC, Bandulik S, Zdebik AA, Reichold , Tobin J, Lieberer E, Sterner C, Lanoure G, Arora R, Sirimanna T, Thompson D, Cross JH, van't Hoff W, Al Masri O, Tullus K, Yeung S, Anikster Y, Klootwijk E, Hubank M, Dillon MJ, Heitzmann D, Arcos-Burgos M, Knepper MA, Dobbie A, Gahl WA, Warth R, Sheridan E, Kleta R (2009). "Epilepsy, ataxie, sensorineural deafness, tubulopathy, and KCNJ10 mutations." N Engl J Med 360 (19): 1960-70.
- Burg M, Stoner L, Cardinal J, Green N (1973). "Furosemide effect on isolated perfused tubules." Am J Physiol 225:119-124.
- Busch AE, Waldegger S, Murer H, Lang F (1996). „The molecules of proximal tubular transport: insights from electrophysiology." Nephron 72:1-8.
- Calo L, Punzi L, Semplicini A (2000). "Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in Bartter's and Gitelman's syndrome: review of the pathogenetic mechanisms." Am J Nephrol 20:347-350.
- Costanzo LS (1985). "Localization of diuretic action in microperfused rat distal tubules: Ca and Na transport." Am J Physiol 248:F527-535.
- Cruz DN, Shaer AJ, Bia MJ, Lifton RP, Simon DB (2001). "Gitelman's syndrome revisited: an evaluation of symptoms and health-related quality of life." Kidney Int 59:710-717.

Cruz DN, Simon DB, Nelson-Williams C, Farhi A, Finberg K, Burleson L, Gill JR, Lifton RP (2001). "Mutations in the Na-Cl cotransporter reduce blood pressure in humans." Hypertension 37:1458-1464.

De Jong JC, Van Der Vliet WA, Van Den Heuvel LP, Willems PH, Knoers NV, Bindels RJ (2002). "Functional expression of mutations in the human NaCl cotransporter: evidence for impaired routing mechanisms in Gitelman's syndrome." J Am Soc Nephrol 13:1442-1448.

De Jong JC, Willems PH, Mooren FJ, van den Heuvel LP, Knoers NV, Bindels RJ (2003). "The structural unit of the thiazide-sensitive NaCl cotransporter is a homodimer." J Biol Chem 278:24302-24307.

Delpire E, Kaplan MR, Plotkin MD, Hebert SC (1996). „The Na-(K)-Cl cotransporter family in the mammalian kidney: molecular identification and function(s)." Nephrol Dial Transplant 11:1967-1973.

Donker AJ, de Jong PE, van Eps LW, Brentjens JR, Bakker K, Doorenbos H (1977). "Indomethacin in Bartter's syndrome: does the syndrome represent a state of hyperprostaglandinism?" Nephron 19:200-213.

Ellison DH, Velazquez H, Wright FS (1987). "Thiazide-sensitive sodium chloride cotransport in early distal tubule." Am J Physiol 253:F546-554.

Estevez R, Boettger T, Stein V, Birkenhager R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ (2001). "Barttin is a Cl- channel beta-subunit crucial for renal Cl- reabsorption and inner ear K+ secretion." Nature 414:558-561.

Fanconi A, Schachenmann G, Nussli R, Prader A (1971). "Chronic hypokalaemia with growth retardation, normotensive hyperrenin-hyperaldosteronism ("Bartter's syndrome"), and hypercalciuria. Report of two cases with emphasis on natural history and on catch-up growth during treatment." Helv Paediatr Acta 26:144-163.

Fishburn CS, Elazar Z, Fuchs S (1995). "Differential glycosylation and intracellular trafficking for the long and short isoforms of the D2 dopamine receptor." J Biol Chem 270:29819-29824.

Flatman PW (2008). "Cotransporters, WNKs and hypertension: an update." Curr Opin Nephrol Hypertens 17(2):186-192.

Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Hebert SC (1994). "Molecular cloning, primary structure, and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney." J Biol Chem 269:17713-17722.

Gamba G, Saltzberg SN, Lombardi M, Miyanoshita A, Lytton J, Hediger MA, Brenner BM, Hebert SC (1993). "Primary structure and functional expression of a cDNA encoding the thiazide-sensitive, electroneutral sodium-chloride cotransporter." Proc Natl Acad Sci U S A 90:2749-2753.

Gascon A, Cobeta-Garcia JC, Iglesias E (1999). "Hypomagnesemia and chondrocalcinosis in Gitelman syndrome." Am J Med 107:301-302.

Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG (1966). „A new familial disorder characterized by hypokalemia and hypomagnesemia." Trans Assoc Am Physicians 79:221-235.

- Gordon RD, Geddes RA, Pawsey CG, O'Halloran MW (1970). "Hypertension and severe hyperkalaemia associated with suppression of renin and aldosterone and completely reversed by dietary sodium restriction." Australas Ann Med 19:287-294.
- Greger R (1985). "Ion transport mechanisms in thick ascending limb of Henle's loop of mammalian nephron." Physiol Rev 65:760-797.
- Ho K, Nichols CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC (1993). "Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel." Nature 362:31-38.
- Hoover RS, Poch E, Monroy A, Vazquez N, Nishio T, Gamba G, Hebert SC (2003). "N-Glycosylation at two sites critically alters thiazide binding and activity of the rat thiazide-sensitive Na(+):Cl(-) cotransporter." J Am Soc Nephrol 14:271-282.
- Jeck N, Derst C, Wischmeyer E, Ott H, Weber S, Rudin C, Seyberth HW, Daut J, Karschin A, Konrad M (2001). „Functional heterogeneity of ROMK mutations linked to hyperprostaglandin E syndrome." Kidney Int 59:1803-1811.
- Jeck N, Konrad M, Peters M, Weber S, Bonzel KE, Seyberth HW (2000). "Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, leading to a mixed Bartter-Gitelman phenotype." Pediatr Res 48:754-758.
- Jeck N, Reinalter SC, Henne T, Marg W, Mallmann R, Pasel K, Vollmer M, Klaus G, Leonhardt A, Seyberth HW, Konrad M (2001). "Hypokalemic salt-losing tubulopathy with chronic renal failure and sensorineural deafness." Pediatrics 108:E5.

- Jeck N, Schlingmann KP, Reinalter SC, Komhoff M, Peters M, Waldegger S, Seyberth HW (2005). "Salt handling in the distal nephron: lessons learned from inherited human disorders." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288:R782-795.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G (1990). "Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes." Nature 348:510-514.
- Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP (2008). "Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation." Nat Genet 40(5): 592-595.
- Kahle KT, Ring AM, Lifton RP (2008). „Molecular physiology of the WNK kinases." Annu Rev Physiol 70:329-355.
- Klinke R. (Hrsg.), Pape H.-C. (Hrsg.), Silbernagel S. (Hrsg.) (2005). "Physiologie". Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York: 326-376.
- Knoers NV, Levtschenko EN (2008). "Gitelman syndrome." Orphanet J Rare Dis 3:22.
- Konrad M, Leonhardt A, Hensen P, Seyberth HW, Kockerling A (1999). "Prenatal and postnatal management of hyperprostaglandin E syndrome after genetic diagnosis from amniocytes." Pediatrics 103:678-683.
- Konrad M, Vollmer M, Lemmink HH, van den Heuvel LP, Jeck N, Vargas-Poussou R, Lakings A, Ruf R, Deschenes G, Antignac C, Guay-Woodford L, Knoers NV, Seyberth HW, Feldmann D, Hildebrandt F (2000). "Mutations in the chloride channel gene *CLCNKB* as a cause of classic Bartter syndrome." J Am Soc Nephrol 11:1449-1459.

- Kramer BK, Kammerl MC, Komhoff M (2004). "Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications." Kidney Blood Press Res 27:43-62.
- Kunau RT, Jr., Weller DR, Webb HL (1975). "Clarification of the site of action of chlorothiazide in the rat nephron." J Clin Invest 56:401-407.
- Kunchaparty S, Palcsó M, Berkman J, Velazquez H, Desir GV, Bernstein P, Reilly RF, Ellison DH (1999). "Defective processing and expression of thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter as a cause of Gitelman's syndrome." Am J Physiol 277:F643-649.
- Landau D, Shalev H, Ohaly M, Carmi R (1995). "Infantile variant of Bartter syndrome and sensorineural deafness: a new autosomal recessive disorder." Am J Med Genet 59:454-459.
- Lemmink HH, Knoers NV, Karolyi L, van Dijk H, Niaudet P, Antignac C, Guay-Woodford LM, Goodyer PR, Carel JC, Hermes A, Seyberth HW, Monnens LA, van den Heuvel LP (1998). "Novel mutations in the thiazide-sensitive NaCl cotransporter gene in patients with Gitelman syndrome with predominant localization to the C-terminal domain." Kidney Int 54:720-730.
- Lemmink HH, van den Heuvel LP, van Dijk HA, Merkx GF, Smilde TJ, Taschner PE, Monnens LA, Hebert SC, Knoers NV (1996). "Linkage of Gitelman syndrome to the thiazide-sensitive sodium-chloride cotransporter gene with identification of mutations in Dutch families." Pediatr Nephrol 10:403-407.
- Lin SH, Cheng NL, Hsu YJ, Halperin ML (2004). "Intrafamilial phenotype variability in patients with Gitelman syndrome having the same mutations in their thiazide-sensitive sodium/chloride cotransporter." Am J Kidney Dis 43:304-312.

- Loffing J, Loffing-Cueni D, Valderrabano V, Klausli L, Hebert SC, Rossier BC, Hoenderop JG, Bindels RJ, Kaissling B (2001). "Distribution of transcellular calcium and sodium transport pathways along mouse distal nephron." Am J Physiol Renal Physiol 281:F1021-1027.
- Massa G, Proesmans W, Devlieger H, Vandenberghe K, Van Assche A, Eggermont E (1987). "Electrolyte composition of the amniotic fluid in Bartter syndrome." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 24:335-340.
- Mastroianni N, Bettinelli A, Bianchetti M, Colussi G, De Fusco M, Sereni F, Ballabio A, Casari G (1996). "Novel molecular variants of the Na-Cl cotransporter gene are responsible for Gitelman syndrome." Am J Hum Genet 59:1019-1026.
- McCredie DA, Blair-West JR, Scoggins BA, Shipman R (1971). "Potassium-losing nephropathy of childhood." Med J Aust 1:129-135.
- McCredie DA, Rotenberg E, Williams AL (1974). "Hypercalciuria in potassium-losing nephropathy: a variant of Bartter's syndrome." Aust Paediatr J 10:286-295.
- Monnens L, Bindels R, Grunfeld JP (1998). „Gitelman syndrome comes of age." Nephrol Dial Transplant 13:1617-1619.
- Monroy A, Plata C, Hebert SC, Gamba G (2000). "Characterization of the thiazide-sensitive Na(+)-Cl(-) cotransporter: a new model for ions and diuretics interaction." Am J Physiol Renal Physiol 279:F161-169.
- Obermuller N, Bernstein P, Velazquez H, Reilly R, Moser D, Ellison DH, Bachmann S (1995). "Expression of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in rat and human kidney." Am J Physiol 269:F900-910.

- Ohlsson A, Sieck U, Cumming W, Akhtar M, Serenius F (1984). "A variant of Bartter's syndrome. Bartter's syndrome associated with hydramnios, prematurity, hypercalciuria and nephrocalcinosis." Acta Paediatr Scand 73:868-874.
- Paver WK, Pauline GJ (1964). "Hypertension and Hyperpotassaemia without Renal Disease in a Young Male." Med J Aust 2:305-306.
- Peters M, Jeck N, Reinalter S, Leonhardt A, Tonshoff B, Klaus GG, Konrad M, Seyberth HW (2002). "Clinical presentation of genetically defined patients with hypokalemic salt-losing tubulopathies." Am J Med 112:183-190.
- Plotkin MD, Kaplan MR, Verlander JW, Lee WS, Brown D, Poch E, Gullans SR, Hebert SC (1996). "Localization of the thiazide sensitive Na-Cl cotransporter, rTSC1 in the rat kidney." Kidney Int 50:174-183.
- Proesmans W (1997). "Bartter syndrome and its neonatal variant." Eur J Pediatr 156:669-679.
- Proesmans W, Massa G, Vandenberghe K, Van Assche A (1987). "Prenatal diagnosis of Bartter syndrome." Lancet 1:394.
- Reinalter S, Devlieger H, Proesmans W (1998). "Neonatal Bartter syndrome: spontaneous resolution of all signs and symptoms." Pediatr Nephrol 12:186-188.
- Reissinger A, Ludwig M, Utsch B, Promse A, Baulmann J, Weisser B, Vetter H, Kramer HJ, Bokemeyer D (2002). "Novel NCCT gene mutations as a cause of Gitelman's syndrome and a systematic review of mutant and polymorphic NCCT alleles." Kidney Blood Press Res 25:354-362.

Ring T, Knoers N, Oh MS, Halperin ML (2002). "Reevaluation of the criteria for the clinical diagnosis of Gitelman syndrome." Pediatr Nephrol 17:612-616.

Rivera-Munoz E, Chang Q, Bindels RJ, Devuyt O (2007). "Gitelman's syndrome: towards genotype-phenotype correlations" Pediatr Nephrol 22:326-332.

Rodrigues Pereira R, Hasaart T (1982). "Hydramnios and observations in Bartter's syndrome." Acta Obstet Gynecol Scand 61:477-478.

Rodriguez-Soriano J, Vallo A, Garcia-Fuentes M (1987). "Hypomagnesaemia of hereditary renal origin." Pediatr Nephrol 1:465-472.

Rosenbaum, P., Hughes, M. (1957). "Persistent, probably congenital, hypokalemic alkalosis with hyaline degeneration of renal tubules and normal urinary aldosteron". Am J Dis Child 94: 560.

Rudin A (1988). "Bartter's syndrome. A review of 28 patients followed for 10 years." Acta Med Scand 224:165-171.

Sabath E, Meade P, Berkman J, de los Heros P, Moreno E, Bobadilla NA, Vazquez N, Ellison DH, Gamba G (2004). "Pathophysiology of functional mutations of the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter in Gitelman disease." Am J Physiol Renal Physiol 287:F195-203.

Schlingmann KP, Konrad M, Jeck N, Waldegger P, Reinalter SC, Holder M, Seyberth HW, Waldegger S (2004). "Salt wasting and deafness resulting from mutations in two chloride channels." N Engl J Med 350:1314-1319.

Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M (2002). "Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family." Nat Genet 31:166-170.

Schmidt, R.F. (Hrsg.), Lang, F. (Hrsg.) (2007). „Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie“, 30. Auflage. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: 684-752.

Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.) (1987). „Physiologie des Menschen“, 23. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York: 778-792.

Scholl UI, Choi M, iu T, Ramaekers VT, Häusler MG, Grimmer J, Tobe SW, Farhi A, Nelson-Williams C, Lifton RP (2009). „Seizures, sensorineural deafness, ataxie, mental retardation, and electrolyte imbalance (SeSAM syndrom) caused by mutations in KCNJ10.“ Proc Natl Acad Sci U S A 106 (14): 5842-5847.

Seyberth HW, Koniger SJ, Rascher W, Kuhl PG, Schweer H (1987). „Role of prostaglandins in hyperprostaglandin E syndrome and in selected renal tubular disorders.“ Pediatr Nephrol 1:491-497.

Seyberth HW, Rascher W, Schweer H, Kuhl PG, Mehls O, Scharer K (1985). "Congenital hypokalemia with hypercalciuria in preterm infants: a hyperprostaglandinuric tubular syndrome different from Bartter syndrome." J Pediatr 107:694-701.

- Simon DB, Bindra RS, Mansfield TA, Nelson-Williams C, Mendonca E, Stone R, Schurman S, Nayir A, Alpay H, Bakkaloglu A, Rodriguez-Soriano J, Morales JM, Sanjad SA, Taylor CM, Pilz D, Brem A, Trachtman H, Griswold W, Richard GA, John E, Lifton RP (1997). "Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III." Nat Genet 17:171-178.
- Simon DB, Karet FE, Hamdan JM, DiPietro A, Sanjad SA, Lifton RP (1996). "Bartter's syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2." Nat Genet 13:183-188.
- Simon DB, Karet FE, Rodriguez-Soriano J, Hamdan JH, DiPietro A, Trachtman H, Sanjad SA, Lifton RP (1996). "Genetic heterogeneity of Bartter's syndrome revealed by mutations in the K⁺ channel, ROMK." Nat Genet 14:152-156.
- Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karet FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitleman HJ, Lifton RP (1996). "Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter." Nat Genet 12:24-30.
- Soreq H (1985). "The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected xenopus oocytes." CRC Crit Rev Biochem 18(3): 199-238.
- Soreq H, Seidman S (1992) "Xenopus oocyte microinjection: From gene to protein." Methods Enzymol 207: 225-265.
- Starremans PG, Kersten FF, Knoers NV, van den Heuvel LP, and Bindels RJ (2003). "Mutations in the human Na-K-2Cl cotransporter (NKCC2) identified in Bartter syndrome type I consistently result in nonfunctional transporters." J Am Soc Nephrol 14:1419-1426.

- Syren ML, Tedeschi S, Cesareo L, Bellantuono R, Colussi G, Procaccio M, Ali A, Domenici R, Malberti F, Sprocati M, Sacco M, Miglietti N, Edefonti A, Sereni F, Casari G, Coviello DA, Bettinelli A (2002). "Identification of fifteen novel mutations in the SLC12A3 gene encoding the Na-Cl Co-transporter in Italian patients with Gitelman syndrome." Hum Mutat 20:78.
- Velazquez H, Good DW, Wright FS (1984). "Mutual dependence of sodium and chloride absorption by renal distal tubule." Am J Physiol 247:F904-911.
- Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JG (2004). "TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption." J Biol Chem 279:19-25.
- Waldegger S, Jeck N, Barth P, Peters M, Vitzthum H, Wolf K, Kurtz A, Konrad M, Seyberth HW (2002). "Barttin increases surface expression and changes current properties of ClC-K channels." Pflugers Arch 444:411-418.
- Wilson FH, Disse-Nicodeme S, Choate KA, Ishikawa K, Nelson-Williams C, Desitter I, Gunel M, Milford DV, Lipkin GW, Achard JM, Feely MP, Dussol B, Berland Y, Unwin RJ, Mayan H, Simon DB, Farfel Z, Jeunemaitre X, Lifton RP (2001). "Human hypertension caused by mutations in WNK kinases." Science 293:1107-1112.
- Wilson FH, Kahle KT, Sabath E, Lalioti MD, Rapson AK, Hoover RS, Hebert SC, Gamba G, Lifton RP (2003). "Molecular pathogenesis of inherited hypertension with hyperkalemia: the Na-Cl cotransporter is inhibited by wild-type but not mutant WNK4." Proc Natl Acad Sci U S A 100:680-684.
- Yang CL, Angell J, Mitchell R, Ellison DH (2003). "WNK kinases regulate thiazide-sensitive Na-Cl cotransport." J Clin Invest 111:1039-1045.

Yang CL, Zhu X, Wang Z., Subramanya AR, Ellison DH (2005). "Mechanisms of WNK1 and WNK4 interaction in the regulation of thiazide-sensitive NaCl cotransporter." J Clin Invest 115(5): 1379-1387.

Zelikovic I, Szargel R, Hawash A, Labay V, Hatib I, Cohen N, Nakhoul F (2003). "A novel mutation in the chloride channel gene, CLCNKB, as a cause of Gitelman and Bartter syndromes." Kidney Int 63:24-32.

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Strukturelle Organisation der Niere	2
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Nephrons mit den einzelnen Anteilen der Na⁺-Rückresorption	5
Abbildung 1-3: Modell der Transportprozesse entlang des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife (TAL)	7
Abbildung 1-4: Modell der transzellulären Transportprozesse entlang des Distalen Abschnitts des Nephrons (DCT)	9
Abbildung 1-5: DCT 1 im distalen Tubulus	9
Abbildung 1-6: DCT 2 im distalen Tubulus	9
Abbildung 1-7: Modell des NCCT mit den zu untersuchenden Mutationen (rot) und Polymorphismen (blau)	23
Abbildung 2-1: Überblick über die QuikChange site-directed Mutagenesis Methode	43
Abbildung 2-2: Izision der Bauchdecke	50
Abbildung 2-3: Entnahme der Oozyten	50
Abbildung 3-1: Funktionelle Analyse des Wildtyps (Flag-NCCT), der Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) und Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C).	61
Abbildung 3-2: Western Blot der Kontrolle (Kontr.), des Wildtyps (WT), der Mutationen (R83W, R135C, T180R, D486N, S614P, G731R, R887Q, V1015M) und der Polymorphismen (G264A, R904Q, R919C).	63
Abbildung 3-3: Wildtyp	64
Abbildung 3-4: Kontrolle	65
Abbildung 3-5: T180R	65
Abbildung 3-6: R83W	66
Abbildung 3-7: Links G731R, Mitte Q887R, Rechts V1015M.	66
Abbildung 3-8: Links R135C, Mitte D486N, Rechts S614P	67
Abbildung 3-9: Funktionelle Analyse mit der WNK1	68

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1:	Klinische Differenzierung der Salzverlusttubulopathien	13
Tabelle 1-2:	Gene und Genprodukte, die ursächlich an den Salzverlusttubulopathien beteiligt sind	14
Tabelle 1-3:	Zusammenfassung bisher untersuchter Mutationen des NCCT beim GS	21
Tabelle 3-1:	Identifizierte Mutationen im SLC12A3 Gen	56
Tabelle 3-2:	Identifizierte Polymorphismen im SLC12A3 Gen	57
Tabelle 3-3:	Zusammenfassung der klinischen Angaben bei den Fallbeispielen	59
Tabelle 3-4:	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Pathomechanismus	69

6.4 Abkürzungsverzeichnis

aBS	Antenatales Bartter Syndrom
ADH	Antidiuretisches Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BS	Bartter Syndrom
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSND	Bartter's syndrome with SND
cBS	classic Bartter Syndrome
Cl ⁻	Chlorid
COOH	Carboxylgruppe
DCT	distal convoluted tubule
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECaC	epithelialer Calciumkanal
EKG	Elektrokardiogram
ENaC	epithelialer Natriumkanal
EtOH	Äthanol
FHHt	familiäre hyperkalämische Hypertension
g	Gramm
GS	Gitelman Syndrom
H ⁺	Wasserstoffionen
HPS	Hyperprostaglandin E Syndrom
K ⁺	Kalium
kD	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Mol
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimol
mmHg	Millimeter Wassersäule
mmol	Millimol
Na ⁺	Natrium
NCCT	Natrium-Chlorid-Cotransporter
ng	Nanogramm
NH ₂	Aminogruppe
NKCC2	Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter
Nm	Newtonmeter
pH	potentia Hydrogenii
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
ROMK	renal-outer-medulla-Kalium-channel
rpm	revolutions per minute
s	Sekunde
SND	sensorineural deafness
SSW	Schwangerschaftswoche
TAL	thick ascending limb
TRPM	transient receptor potential ion channels
V	Volt
WNK	With No K (Lysin)
WT	Wildtyp
µg	Microgramm
µl	Microliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius

6.5 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Prof. Dr. Arnold, Prof. Dr. Aumüller, Prof. Dr. Dr. Basler, Prof. Dr. Baum, PD Dr. Becker, Prof. Dr. Behr, Prof. Dr. Bertalanffy, Dr. Boudriot, Prof. Dr. Cetin, Prof. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. Dr. Daut, Prof. Dr. Fuchs, Prof. Dr. Gemsa, PD Dr. Gerdes, Prof. Dr. Görg, Prof. Dr. Gotzen, Prof. Dr. Griss, Prof. Dr. Grzeschik, Prof. Dr. Gudermann, Prof. Dr. Happle, Prof. Dr. Dr. Hartmann, Prof. Dr. Hasilik, Prof. Dr. Heeg, Prof. Dr. Hofmann, Dr. Jackowski-Dohrmann, Prof. Dr. Joseph, Prof. Dr. Jungclas, Prof. Dr. Kern, Dr. Kill, Prof. Dr. Klenk, Prof. Dr. Klose, Prof. Dr. Krause, Prof. Dr. Kretschmer, Prof. Dr. Krieg, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Koolmann, Prof. Dr. Kuhn, Prof. Dr. Krause, Prof. Dr. Kroll, Prof. Dr. Lang, Prof. Dr. Lennartz, Prof. Dr. Lenz, Prof. Dr. Lorenz, Prof. Dr. Maisch, Prof. Dr. Maier, Prof. Dr. Mennel, Prof. Dr. Moll, Prof. Dr. Moosdorf, Prof. Dr. Dr. Mueller, Prof. Dr. Mutters, Prof. Dr. Neubauer, Prof. Dr. Niessing, Prof. Dr. Oertel, Prof. Dr. Radsak, Prof. Dr. Remschmidt, Prof. Dr. Renz, Prof. Dr. Richter, Prof. Dr. Roehm, Prof. Dr. Rothmund, Prof. Dr. Schäfer, Prof. Dr. Schmidt, Dr. Schmidt, PD Dr. Schnabel, Dr. Schrader Prof. Dr. Schüffel, Prof. Dr. Schulz, Prof. Dr. Schwarz, Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Seyberth, Prof. Dr. Slenczka, Prof. Dr. Sommer, Prof. Dr. Steiniger, Prof. Dr. Sturm, Prof. Dr. Vogelmeier, Prof. Dr. Vohland, Prof. Dr. Voigt, Prof. Dr. Wagner, Prof. Dr. Weihe, Prof. Dr. Weiler, Prof. Dr. Werner, Prof. Dr. von Wichert, Prof. Dr. Wulf.

In Frauenfeld, Schweiz	(Innere PJ):	PD Dr. med. B. Frauchiger
In Bern, Schweiz	(Pädiatrie PJ):	Prof. Dr. med. M. H. Schöni
In Berlin	(Chirurgie PJ):	Prof. Dr. med. H. Kienapfel
		Prof. Dr. med. K.-J. Bauknecht

6.6 Danksagung

An dieser Stelle habe ich nun die Gelegenheit mich bei allen von Herzen zu bedanken, die mich im Laufe der Arbeit unterstützt haben.

Besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Siegfried Waldegger, dass er mir die Möglichkeit gab, die Doktorarbeit unter seiner Aufsicht im Labor der Kinderklinik durchführen zu dürfen. Ich danke ihm für das interessante Thema, die freundliche Betreuung und seine kompetente, unkomplizierte und herzliche Art. Mein Dank gilt außerdem Petra Waldegger, die ich leider nicht im Labor kennen lernen durfte, aber mit deren Protokollen und Lösungen ich viel arbeiten konnte.

Einen weiteren großen Dank schulde ich meiner Betreuerin Jolanta Heinzinger, die mich im Labor anlernte und mir immer hilfsbereit bei jeglicher Fragen zur Seite stand.

Dann möchte ich mich noch bei Ulla für ihre Hilfsbereitschaft, tatkräftige Unterstützung und Gesellschaft im Labor bedanken.

Nicola Jeck bin ich sehr dankbar für die Mutationen und die Patientendaten, die er mir für die Arbeit bereitwillig zur Verfügung gestellt hat.

Außerdem möchte ich mich bei Carsten bedanken, der mich auf die Idee gebracht hat in dem Labor von Siegfried Waldegger die Arbeit zu absolvieren.

Ein besonderer Dank gilt außerdem meinen Freunden Tobi, Cookie und Claas, die mit mir den Kampf mit dem PC aufnahmen.

Vor allem möchte ich aber auch meiner Familie, allen voran meinen Eltern, für ihre begleitende Unterstützung danken.

6.7 Ehrenwörtliche Erklärung

6.8 Lebenslauf